ACADÉMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat - Mention SCIENCES

ETUDE D'UNE NUCLEASE DE CELLULES D'ASCITES KREBS II SPECIFIQUE DU RNA DOUBLE CHAINE. (RNASE D). RÔLE EVENTUEL DANS LES PROCESSUS DE MATURATION DES RNA EUCARYOTES.

par

Jocelyne RECH

Soutenue le Septembre 1979 devant la Commission d'Examen.

JURY :

Mme	H.	COLSON-GUASTALLA	Président
M.	J.M.	BLANCHARD	Assesseurs
M.	R.	CROUCH	
M.	PH.	JEANTEUR	
M.	B.	LEBLEU	
M.	A.	SENTENAC	

ATELIER DUPLICATION
— U.S.T.L. —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546012_0036

ACADÉMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat - Mention SCIENCES

ETUDE D'UNE NUCLEASE DE CELLULES D'ASCITES KREBS II SPECIFIQUE DU RNA DOUBLE CHAINE. (RNASE D). RÔLE EVENTUEL DANS LES PROCESSUS DE MATURATION DES RNA EUCARYOTES.

par

Jocelyne RECH

Soutenue le Septembre 1979 devant la Commission d'Examen.

JURY :

Mme	H.	COLSON-GUASTALLA	Président
M.	J.M.	BLANCHARD	Assesseurs
M.	R.	CROUCH	
M.	PH.	JEANTEUR	
M.	B.	LEBLEU	
M.	A.	SENTENAC	

ATELIER DUPLICATION
— U.S.T.L. —

U N I V E R S I T E
DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC

L I S T E D E S P R O F E S S E U R S

Président : L. THALER

Vices-Présidents :
MM. CORRIU, PIETRASANTA et NOUAZE.

Doyens Honoraires à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :
P. MATHIAS
B. CHARLES
A. CASADEVALL.

Président Honoraire :
P. DUMONTET.

Professeurs Honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc

- R. JACQUES
- M. CASTERAS
- E. TURRIERE
- C. CAUQUIL
- G. DENIZOT
- J. GRANIER
- Ch. BOUHET
- J. SALVINIEN
- M. MOUSSERON
- P. CHATELAIN
- A.M. VERGNOUX
- E. KAHANE
- Ch. SAUVAGE
- J.M. MORETTI
- G. COUCHET
- P. DEMANGEON.

Secrétaire Général :
E. SIAU

Professeurs titulaires:

- M. J. AVIAS ..... Géologie
- M. JJ. MOREAU ..... Mécanique rationnelle

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

- M. Ch. CASTAING ..... Mathématiques
- M. M. ROUZEYRE ..... Physique
- M. F. PROUST ..... Géologie
- M. J. PARIS ..... Biologie Animale
- M. A. GROTHENDIECK ..... Mathématiques
- M. C. DURANTE ..... Physique
- M. G. BOUGNOT ..... Physique
- M. G. LECOY ..... E. E. A.
- M. R. GAUFRES ..... Chimie
- M. JD BAYLE ..... Physiologie Animale
- M. JL IMBACH ..... Chimie
- M. JP FILLARD ..... E. E. A.
- M. N. ROBY ..... Mathématiques
- M. Ph JEANTEUR ..... Biochimie
- M. M. AMANIEU (*I.S.I.*) ..... Hydrologie et Mariculture
- M. A. COMMEYRAS ..... Chimie Organique

Professeurs sans Chaire :

- M. G. TOURNE ..... Chimie
- M. J. REMY ..... Géologie
- Mme H. GUASTALLA ..... Biologie physico-chimique
- M. R. LENEL ..... Biologie Animale
- M. A. BASSOMPIERRE ..... Physique
- M. R. JONARD ..... Botanique
- M. R. CANO (*I.U.T.*) ..... Mesures Physiques
- M. P. MOLINO ..... Mathématiques
- M. J. LEGRAND ..... Physiologie Animale
- M. J. D'AUZAC ..... Physiologie Végétale
- M. G. BOUIX ..... Zoologie
- M. M. DENIZOT ..... Biologie Végétale
- M. B. BRUN ..... Chimie Physique
- M. L. GIRAL ..... Chimie Organique
- M. JP QUIGNARD ..... Zoologie
- M. Ph VIALLEFONT ..... Chimie
- M. A. RAIBAUT ..... Zoologie

- M. P. VITSE ..... Chimie Minérale
- M. J. GRIMAUD (*E.N.S.C.M.*) ..... Chimie
- M. J. GARCIA (*I.U.T.-NIMES*) ..... Génie Mécanique
- M. P. LOUIS ..... Géophysique Appliquée
- M. Cl BOCQUILLON ..... Hydrologie
- M. A. DONNADIEU ..... Physique
- M. M. LEFRANC ..... Mathématiques
- M. G. MASCHERPA ..... Chimie
- M. C. GOUT ..... Physique
- M. JP TRILLES ..... Biologie Appliquée
- M. F. HALLE ..... Biologie Végétale
- M. G. BORDURE ..... Génie Electrique
- M. JP NOUGIER ..... Electronique
- M. M. GODRON ..... Ecologie Végétale
- M. L. LASSABATERE ..... E. E. A.
- M. J. LAPASSET ..... Physique - Mesure physiqu
- M. M. AVEROUS ..... Physique - Génie électriq
- M. G. MAURY ..... Chimie
- M. G. LOUPIAS ..... Mathématiques
- M. R. BEN AIM (*I.S.I.*) ..... Génie chimique et Traitement des Eaux.

Professeurs Associés :

- M. M. MICALI ..... Mathématiques
- M. H. BILGER ..... Physique
- M. G. AUBERSON ..... Mathématiques.

Professeurs associés d'Université :

- M. L. DAUZIER ..... Physiologie Animale
- M. GALZY ..... Biochimie
- M. C. MAURIN ..... Biologie Animale
- M. R. SENOUILLET ..... Economie et Gestion
- M. E. SERVAT ..... Géologie
- M. C. VAGO ..... Biologie Animale
- Mme M. VAN CAMPO ..... Biologie Végétale
- M. E. VERDIER ..... Chimie
- M. F. WINTERNITZ ..... Chimie.

Maîtres de Conférences :

- M. R. HAKIM ..... Mathématiques
- M. F. LAPSCHER ..... Mathématiques
- M. J. CROUZET (I.S.I) ..... Biochimie Appliquée
- Mle M. LEVY (I.U.T.) ..... Chimie
- M. J. LAGARRIGUE (I.U.T.) ..... Biologie Appliquée
- M. Cl DROGUE (I.S.I.) ..... Hydrogéologie
- M. P. GENESTE (E.N.S.C.M.) ..... Chimie Physique Appliqué

- M. J. CHEFTEL (I.S.I.) ..... Biochimie Appliquée à l'Alimentation.

- M. Y. PIETRASANTA (E.N.S.C.M.) ..... Chimie Appliquée

- M. B. LEMAIRE (I.S.I.) ..... Mathématiques Appliquées Informatique.

- M. H. MATHIEU (I.S.I.) ..... E. E. A.
- M. M. VALADIER ..... Mathématiques
- M. JL ROBERT (I.U.T. - NIMES) ..... Génie électrique
- M. O. MAISONNEUVE ..... Mécanique
- M. R. BRUNEL ..... Physique
- M. M. CADENE ..... Physique
- M. P. DELORD ..... Physique
- M. A. PAVIA ..... Chimie
- M. JM BESSIERES ..... Chimie
- M. JP BARD ..... Géologie
- M. P. JOUANNA (I.U.T. - NIMES) ..... Génie Civil

- M. P. BESANCON (I.S.I.) ..... Physiologie de la nutrition appliquée à l'alimentation.

- M. Y. NOUAZE ..... Mathématiques
- M. J. PETRISSANS ..... Chimie

- M. JY GAL ..... Chimie analytique appliquée.

- M. C. BENOIT ..... Physique
- M. H. GIBERT (*I.S.I.*) ..... Génie Alimentaire
- M. A. LIEGEOIS (*I.S.I.*) ..... Automatique
- M. L. COT (*E.N.S.C.M.*) ..... Chimie
- M. B. TARODO DE LA FUENTE (*I.S.I.*) ..... Biochimie Appliquée et Techniques des Matière alimentaires.
- M. Y. ESCOUFIER ..... Informatique
- M. A. SANS ..... Psychophysiologie
- M. G. DURAND ..... Chimie
- M. B. FILLIATRE (*I.S.I.*) ..... Informatique et Gestio
- M. JJ MACHEIX ..... Physiologie Végétale
- M. P. HINZELIN ..... Génie Civil
- M. Cl BOKSENBAUM ..... Informatique
- M. G. CAMBON (*I.S.I.*) ..... E. E. A.
- M. J. FERRIE (*I.S.I.*) ..... Informatique
- M. E. AKUTOWICZ ..... Mathématiques
- M. D. AUVERGNE (*I.S.I.*) ..... E. E. A.
- M. B. LEBLEU ..... Biochimie

Maître de Conférences agrégé :

- M. R. REIX ..... Sciences de Gestion.

Maîtres de Conférences Associés :

Néant.

Chargé d'Enseignement :

Néant.

Chargé des fonctions de Maître de Conférences :

- M. G. SAUMADE (*I.U.T.*) ..... G. E. A. (*Economie des entreprises*).

Chargés de Cours :

- M. M. MOUTON (*I.U.T.*) ..... Economie et Gestion
- M. Ph FOUCOU (*I.U.T.*) ..... Sciences économiques.

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION 1

METHODES 5

A - PREPARATION DES SUBSTRATS 5

B - MESURE DE L'ACTIVITE RNAse D 13

C - MESURES DES AUTRES ACTIVITES ENZYMATIQUE 14

D - OBTENTION DES CELLULES D'ASCITES 15

E - ELECTROPHORESE DE PROTEINES 15

F - SEPARATION DES PRODUITS DE DIGESTION SUR COLONNE DE DEAE-SEPHADEX 16

G - DIVERSES METHODES 16

CHAPITRE I - PURIFICATION 17

A - PROTOCOLE 18

B - RESULTATS ET DISCUSSION 24

CHAPITRE II - PROPRIETES DE LA RNAse D 32

A - PROPRIETES ENZYMATIQUES 32

B - PROPRIETES MOLECULAIRES 45

CHAPITRE III - ETUDE DES PRODUITS DE DIGESTION 49

A - TAILLE DES FRAGMENTS 49

B - NATURE DES EXTREMITES 60

CHAPITRE IV - ETUDE DE LA MATURATION DE RNA PRECURSEURS EUCARYOTES 63

A - CLIVAGE DU RNA PRERIBOSOMAL 45S 64

B - ACTION DE LA RNAse D SUR LES hnRNP DE CELLULES HeLa 66

C - CONCLUSION 69

CONCLUSION 70

RESUME 74

BIBLIOGRAPHIE 75

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été réalisé de Septembre 1974 à Juin 1979 et a bénéficié de collaborations :

La préparation des grilles et l'examen au microscope électronique du RNA de $\phi 6$ ont été réalisés par Bernard REVET (Institut Gustave Roussy-Villejuif).

L'étude de la configuration des régions double chaîne par fluorescence du BET a été réalisée par Jacques PAOLETTI (Institut Gustave Roussy - Villejuif).

Le travail concernant les RNAses H d'ascites a été poursuivi par Guy CATHALA au laboratoire.

L'étude consacrée à la RNAse D des hnRNP de cellules HeLa a été faite en collaboration avec Claude BRUNEL au laboratoire.

Que toutes ces personnes avec qui j'ai eu en outre d'intéressantes discussions soient sincèrement remerciées pour cette précieuse collaboration.

Nous remercions vivement les personnes suivantes pour les produits qu'elles nous ont gracieusement donnés :

J.L. Van Etten, Lincoln	: Phage ϕ6 et souche HB 10Y
W. Fiers, Gent	: Phage MS2 et souches D11, CR63
E. Domingo, Genève	: Forme réplicative du phage Qβ
P. Giacomoni, Villejuif	: RNA-Polymérase et Polynucléotide kinase
M. Thang, Paris	: Polynucléotide phosphorylase
H.D. Robertson, New-York	: RNAse III de E. Coli

M A T E R I E L S

Produits chimiques courants } Fluka, Merck, Prolabo, qualité analytique

Produits pour la culture bactérienne } Difco

Séphadex G-75, G-100, G-200	Pharmacia
Sépharose 4B	
Octyl et phényl Sépharose	
DE A-25	
Dextrane T-500	
DE-52	Whatman
CM-52	
Phosphocellulose PC-11	
Cellulose CF-11	
Homoribopolymères	Boerhinger
Mono, di et Triphosphates	
Poly r(I) - poly r(C) agarose	PL Biochemicals
Poly d(AT)	

Aminophényl UMP agarose } Miles

Phosphodiestérase 1	Worthington
RNAse A code R	
DNAse 1 code DPFF	

Phosphatase alcaline (E. Coli) Type III-R } Sigma

RNAse T_1 } Sankyo
RNAse T_2 }

$^{3}H^{32}PO_4$ } CEA, Saclay

|8-^{3}H| Adénosine 5'-triphosphate }
|8-^{3}H| Guanosine 5'-triphosphate }
Adénosine 5'- |α-^{32}P| triphosphate } Radiochemical Centre Amersham
Guanosine 5'- |α-^{32}P| triphosphate }
Uridine 5'-|α-^{32}P| triphosphate }

DEFINITION DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ssRNA	RNA simple chaine
dsRNA	RNA double chaine
hnRNA	RNA hétérogène nucléaire
tRNA	RNA de transfert
ssRNAse	enzyme hydrolysant le RNA simple chaine
dsRNAse	enzyme hydrolysant le RNA double chaine

1 x SSC	Tampon citrate trisodique 0.015 M pH 7, NaCl 0.15 M
TSE	Tampon Tris-HCl 0.05 M pH 7, NaCl 0.1 M, EDTA 0.01 M

PEG	polyéthylèneglycol
BET	bromure d'éthidium
EDTA	acide éthylènediaminotétracétique
DTT	dithiothréitol
PMSF	fluorure de phénylméthyl-sulfonyle
SDS	sodiumdodecylsulfate
TCA	acide trichloracetique
PCA	acide perchlorique
$SO_4(Am)_2$	sulfate d'ammonium
$Mg(Ac)_2$	acétate de magnésium

I N T R O D U C T I O N

Le travail qui va être exposé se propose essentiellement de mettre en évidence et de décrire un système enzymatique d'origine eucaryote susceptible de reproduire in vitro un des évènements survenant au cours de la maturation des RNA eucaryotes.

Lorsque nous avons abordé ce sujet Robertson avait découvert et décrit chez E. Coli une nouvelle RNAse se distinguant des autres par sa capacité d'hydrolyser d'une manière endonucléolytique le RNA bicaténaire synthétique ou naturel (Robertson et al., 1968). Cette enzyme appelée RNAse III (E.C. 3.1.4.24.) est faiblement associée aux ribosomes, exige magnésium ou manganèse pour l'hydrolyse qui, lorsqu'elle est exhaustive libère à partir du polymère double chaîne des fragments de 15 à 25 nucléotides (Shweitz et Ebel, 1971) (Robertson et Hunter, 1975). L'enzyme paraît être constituée de deux sous-unités de masse moléculaire 25 000 (Robertson, 1977) et se différencie physiquement de la RNAse H qui hydrolyse la chaîne RNA d'un hybride RNA-DNA (Crouch, 1974) (Robertson et Dunn, 1975).

Grâce à la production d'un mutant de E. Coli défectif en RNAse III (Kindler et al., 1973) et à la faveur de travaux sur la transcription in vitro du DNA de phage T7 (Dunn et Studier, 1973), il fut montré que la RNAse III effectuait in vitro et in vivo des coupures sur le messager nouvellement synthétisé (Robertson et Dunn, 1975). Sans décrire entièrement ce système fort bien connu actuellement, précisons qu'immédiatement après l'infection, le phage T7 est transcrit sur 20 % de son génome par la RNA-polymérase de l'hôte en un unique messager contenant l'information de cinq gènes.

Ce messager polycistronique est recoupé dans la bactérie de type sauvage pour donner les cinq messagers correspondants, alors qu'il reste tel quel dans la souche déficiente en RNAse III (Dunn et Studier, 1973). Ceci a pu être confirmé in vitro : le DNA purifié de phage T7 est transcrit in vitro par la RNA-polymérase de E. Coli en un messager polycistronique ; par addition de RNAse III purifiée on obtient les cinq messagers analogues à ceux que l'on observe in vivo (Dunn et Studier, 1973). La séquence autour des sites de clivage a pu être élucidée (Kramer et al., 1974) (Rosenberg et al., 1974). Un phénomène semblable a été retrouvé chez le phage T3 (Dunn et al., 1976) et T4 (Robertson et Dickson, 1974).

Dans le même temps il fut aussi prouvé que la RNAse III participait à la production des espèces ribosomales 16S et 23S à partir du RNA transcrit comme une seule unité (Nikolaev et al., 1973). Bien que le système soit plus complexe que le précédent, donc moins connu, il semble que la RNAse III intervient en premier lieu au niveau du précurseur, d'autres RNAses étant ensuite nécessaires pour terminer la maturation des RNA 16S et 23S (Gegenheimer et al., 1977). Actuellement, la RNAse III est encore constamment signalée pour différentes interventions dans la biogénèse de différents RNA procaryotes (Lozeron et al., 1977) (Hagen et Young, 1978) (Mc Clain, 1979).

Chez les eucaryotes le problème n'est que plus complexe car pratiquement aucune des espèces de RNA trouvées dans le cytoplasme n'est transcrite telle quelle à partir du DNA. Deux sont particulièrement intéressantes : les RNA ribosomaux et les RNA messagers.

- Les RNA ribosomaux 18S et 28S sont contenus dans un unique précurseur de taille 45S synthétisé dans le nucléole (Jeanteur et Attardi, 1969) et sont libérés à partir de celui-ci selon une voie impliquant des coupures successives (Wellauer et Dawid, 1974) (Winicov et Perry, 1974).

- Les RNA messagers sont probablement issus des RNA hétérogènes nucléaires (hnRNA) (Jacobson et al., 1974) (Darnell, 1975) et on pense que de grandes régions de ces hnRNA sont excisées avant de donner naissance aux RNA messagers que l'on trouve dans le cytoplasme. Le phénomène de "splicing" découvert récemment (Aloni et al., 1977) (Berget et al., 1977) confirme fortement cette notion de modification de taille du hnRNA mais introduit une complexité supplémentaire puisque, après excision, il y aurait ligature des régions conservées dans le messager.

De toute évidence il apparaît certain que des scissions sont opérées au cours de la maturation des RNA de cellules eucaryotes et nous avons recherché une enzyme pouvant les réaliser.Il apparaît tout aussi évident que cette enzyme, à l'inverse de la plupart des RNAses connues ne doit pas dégrader la molécule mais opérer des coupures uniquement à des sites précis. Ceci implique en conséquence que des signaux de reconnaissance destinés à la nucléase soient portés par le précurseur. On sait depuis longtemps que des structures en boucle ou en épingle à cheveux -donc double chaîne- existent dans le hnRNA (Montagnier, 1968) (Jelinek et Darnell, 1972) (Robertson et al., 1977) ; il a été supposé que ces structures pouvaient constituer un de ces signaux de reconnaissance (Robertson et Dickson, 1974). A l'appui de cette hypothèse on peut remarquer que ces régions double chaîne ne sont pas retrouvées dans le RNA messager (Jelinek et Darnell, 1972). Comme d'autre part le messager peut s'hybrider avec les régions double chaîne du hnRNA (Naora et Whitelam, 1975) (Ryskov et al., 1976) on peut supposer qu'une moitié seulement de ces structures cibles seraient perdues pendant la maturation.

Nous avons donc recherché chez les eucaryotes une enzyme capable de dégrader in vitro le RNA bicatenaire c'est-à-dire l'enzyme équivalente de la RNAse III de E. Coli. La nucléase ainsi définie a été nommée RNAse D comme l'a suggéré Robertson (Robertson et Dickson, 1974).

Il n'est pas douteux que cette démarche laisse subsister une ambiguïté et peut-être une mauvaise représentation du phénomène tel qu'il existe in vivo. En effet s'il est parfaitement établi que la RNAse III solubilise in vitro le dsRNA en scindant les deux chaînes, les modèles élaborés à partir de l'expérimentation sur le phage T7 montrent que la RNAse III peut introduire des coupures dans des régions non appariées (Robertson et Barany, 1978). De plus l'ensemble des données acquises chez les procaryotes n'a pas encore permis de dégager complétement le mécanisme de reconnaissance de la RNAse III dans son action in vivo. Il nous apparait certain que le RNA bicaténaire ne réflète que très grossièrement les substrats physiologiques de l'enzyme.

Les cellules d'ascites Krebs II ont été choisies comme matériel pour la commodité d'obtention, et l'indice qu'une dsRNAse y était présente (Robertson et Mathews, 1973).

Dans le même temps que nous poursuivions ce travail, la RNAse D a été signalée dans d'autres tissus et purifiée à partir de certains d'entr'eux comme nous en référons dans le texte ci-après.

M E T H O D E S

A - *PREPARATION DES SUBSTRATS*

a) Poly r(AU)

Le poly d(AT) sert de matrice à la RNA polymérase de E. Coli dans des conditions inspirées de Berkover et al. (1973).

Une préparation type contient dans 2 ml de tampon Tris-HCl 0.04 M pH 8, DTT 0.001 M, KCl 0.1 M, $MgCl_2$ 0.008 M, sérum albumine 15 µg/ml :

30 µg de poly d (AT)
0.6 µmole d'UTP
0.3 µmole d'ATP
100 µCi de $|^3H|$ATP
80 µg de RNA polymérase

L'incorporation à 37° est suivie par comptage de la radioactivité du matériel insolubilisé en milieu TCA 5 %, pyrophosphate de sodium 0.01M.

Lorsque la synthèse s'arrête (30 à 40 min), l'incubation est poursuivie en présence de 10 µg/ml de DNAse I pendant 20 min à température ambiante. Le mélange est ensuite amené à 1 % en SDS et le RNA est extrait par un demi volume de phénol saturé de tampon SSC, puis précipité par l'éthanol.

Le culot recueilli par centrifugation est redissous dans 0.5 ml de tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.15 M puis filtré sur une colonne de Séphadex G-50 fine équilibré dans ce même tampon (ceci afin d'éliminer l'excès des précurseurs) (voir Fig. 1). Le $|^3H|$ poly r(AU), récupéré par précipitation alcoolique à partir du pic A, est conservé en KCl 0.15 M à -20°.

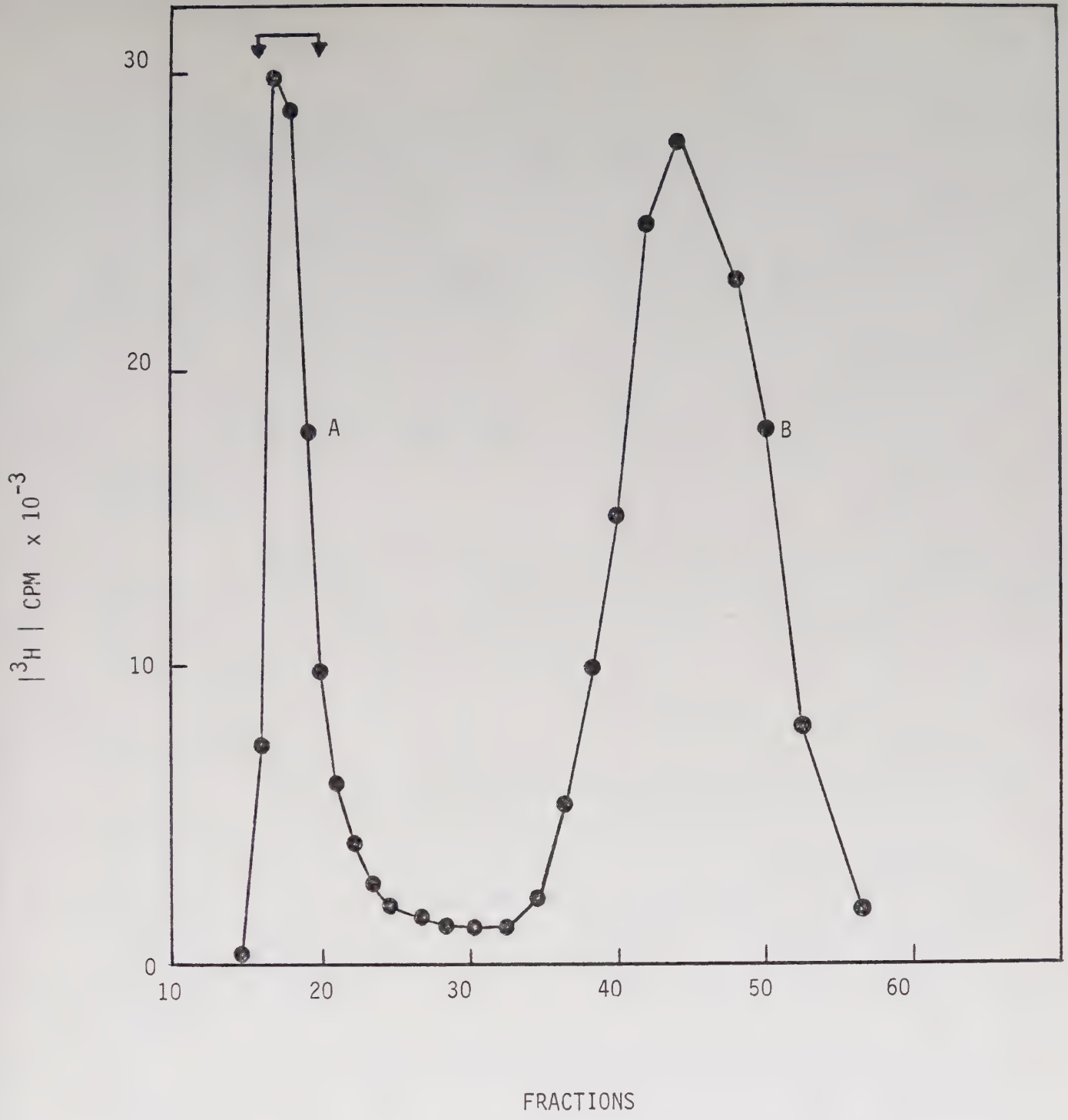


Figure 1 - *Séparation du $|^3H|$ poly r(AU) de l'excès des précurseurs triphosphates.*

Le matériel obtenu après extraction au phénol et précipitation par l'éthanol est redissous dans 0.5 ml de tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.15 M et filtré sur une colonne de Sephadex G-50 fine (1 x 12 cm) équilibré dans ce tampon. Le volume des fractions recueillies est de 0.2 ml. La radioactivité est mesurée sur des aliquotes de 5 µl comptées en scintillant-Triton. Les fractions indiquées par les flèches sont rassemblées et additionnées de deux volumes d'éthanol.

Nous synthétisons généralement par ce protocole 70 nmoles de substrat (ε molaire 6100) possédant une activité spécifique de 40.10^3 cpm/nmole.

Nous synthétisons d'une manière identique du $|^{32}P|$ poly r(AU) à partir de $|^{32}P|$ ATP et nous permutons les quantités ATP, UTP froids pour synthétiser en présence de $|^{32}P|$ UTP.

b) Poly rC) - poly (rG)

1ère méthode

On hybride un brin de poly (rG) froid à un brin de poly (rC) radioactif synthétisé par la polynucléotide phosphorylase. Ce protocole décrit dans l'article 1 annexé à ce texte a été utilisé une seule fois et nous n'y reviendrons pas.

2ème méthode

Nous utilisons la RNA polymérase de E.Coli pour transcrire une chaîne de poly (rC) selon une technique inspirée de Dézelée et al (1974 -a). Le poly (rC) est dissous à 4 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 8, $SO_4(Am)_2$ 1 M, EDTA 10^{-3}M, dialysé extensivement contre une solution d'EDTA 10^{-3}M puis contre un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 8, $SO_4(Am)_2$ 0.1 M, EDTA 10^{-3}M et finalement ajusté à 1 mg/ml dans ce dernier tampon (Dézelée et al (1974-b).

La réaction s'opère en milieu Tris-HCl 0.07 M pH 8, $SO_4(Am)_2$ 0.050 M, $MnCl_2$ $3.1\ 10^{-3}$M, DTT 5.10^{-3} M, GTP $0.3\ 10^{-3}$M, $|^3H|$ GTP $0.15\ 10^{-5}$M. (Toutes ces solutions sont stérilisées par filtration). L'incubation est faite à 37° en présence de 25 µg/ml de poly (rC) et de 70 µg/ml de RNA polymérase. La synthèse est estimée comme pour le poly r(AU).

Lorsque le plateau est atteint, le mélange est rendu 0.2 M NaCl et l'incubation se poursuit à température ambiante pendant 15 min en présence de RNAse A (2 µg/ml) et de RNAse T_1 (2 U/ml). L'action des enzymes est stoppée par 1 % SDS et l'échantillon est laissé 60 min dans la glace en présence de 0.2 M KCl puis centrifugé à 12000 x g.

Le surnageant est extrait par un volume de phénol saturé d'eau, et le polymère synthétisé est précipité par l'éthanol, puis filtré sur une

colonne de Séphadex G-50 fine comme décrit ci-dessus.

2 ml de milieu réactionnel permettent de fabriquer 100 nanomoles de $|^3H|$ poly (rG) - poly (rC) (ε molaire 7400), d'activité spécifique 45.10^3 cpm/nmole.

c) RNA de phage Φ6

Le phage Φ6 est produit par infection de la souche HB10 Y de *Pseudomonas phaseolicola* selon la technique de Vidaver et al. (1973) que nous avons adaptée à nos besoins.

Préparation du phage. La souche HB10 Y est cultivée à 25° dans 50 ml de milieu NBY (Nutrient broth 0.8 %, yeast extract 0.2 %, PO_4H_2K 0.05 %, PO_4HK_2 0.2 %, glucose 0.5 %, SO_4Mg 10^{-3}M) jusqu'à 0.4 de densité optique à 640 nm (2.10^8 bactéries/ml). 2.10^{10} phages sont alors ajoutés pour avoir une multiplicité d'infection égale à 2 environ. Lorsque la lyse est terminée (2 à 3 h) nous versons ce lysat dans 500 ml de culture bactérienne portée à 0.5 de densité optique qui lysera à son tour après 3 à 4 h.

Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation (15 min à 10 000 x g) et le surnageant est rendu 0.5 M en NaCl et 10 % en polyéthylèneglycol sous agitation à 4°. Après une attente de 3 h le précipité est collecté par centrifugation (15 min à 10 000 x g) ; le culot est remis en suspension dans 30 ml de tampon phosphate de potassium 0.0125 M pH 7. Le phage est sédimenté par centrifugation (2 h à 60 000 x g), redissous dans 2 ml de tampon phosphate puis purifié dans un gradient de saccharose 10-35 % p/p en tampon phosphate (SW 27, 2.5 h à 23000 RPM). Le phage recueilli à l'intérieur du gradient (bande blanche) est sédimenté à nouveau comme ci-dessus puis redissous dans 0.5 ml de tampon phosphate et stocké à -70° pour des préparations ultérieures.

Préparation du RNA. Le RNA est préparé par quatre extractions successives avec le mélange phénol-chloroforme 4 : 1 (v/v), opérées sur une solution de phage présentant 5 à 10 unités d'absorbance à 260 nm et amenée à 1 % SDS. Lors de la précipitation éthanolique nous ne prélevons que le RNA capable de s'enrouler au bout d'une pipette pasteur. Après séchage ce RNA est redissous dans un tampon Tris-HCl 0.01 M pH 7, KCl 0.05 M, $MgCl_2$ 0.0025 M, traité par 10 µg/ml de DNAse I (30 min à 20°) puis par 10 µg/ml de RNAse A

(30 min à 20°) après ajustement du milieu en 1 x SSC. Une nouvelle extraction SDS-phénol-chloroforme est opérée et le RNA est récupéré comme décrit ci-dessus. Nous préparons généralement 250 nmoles de dsRNA par cette méthode.

Préparation de $|^{32}P|$ *RNA.* La culture est faite comme précédemment, sauf que, dans le milieu NB Y, nous avons réduit de 50 % la quantité de nutrient broth et de 90 % la quantité de phosphate. Le ^{32}P est ajouté à la culture bactérienne 30 min avant l'addition du pré-lysat. Nous n'avons obtenu que des activités spécifiques médiocres (10^4 cpm/ µg) mais le phage Φ6 s'étant révélé assez peu facile à préparer, il ne nous a pas été loisible d'améliorer la technique de marquage.

d) Forme réplicative du phage MS_2

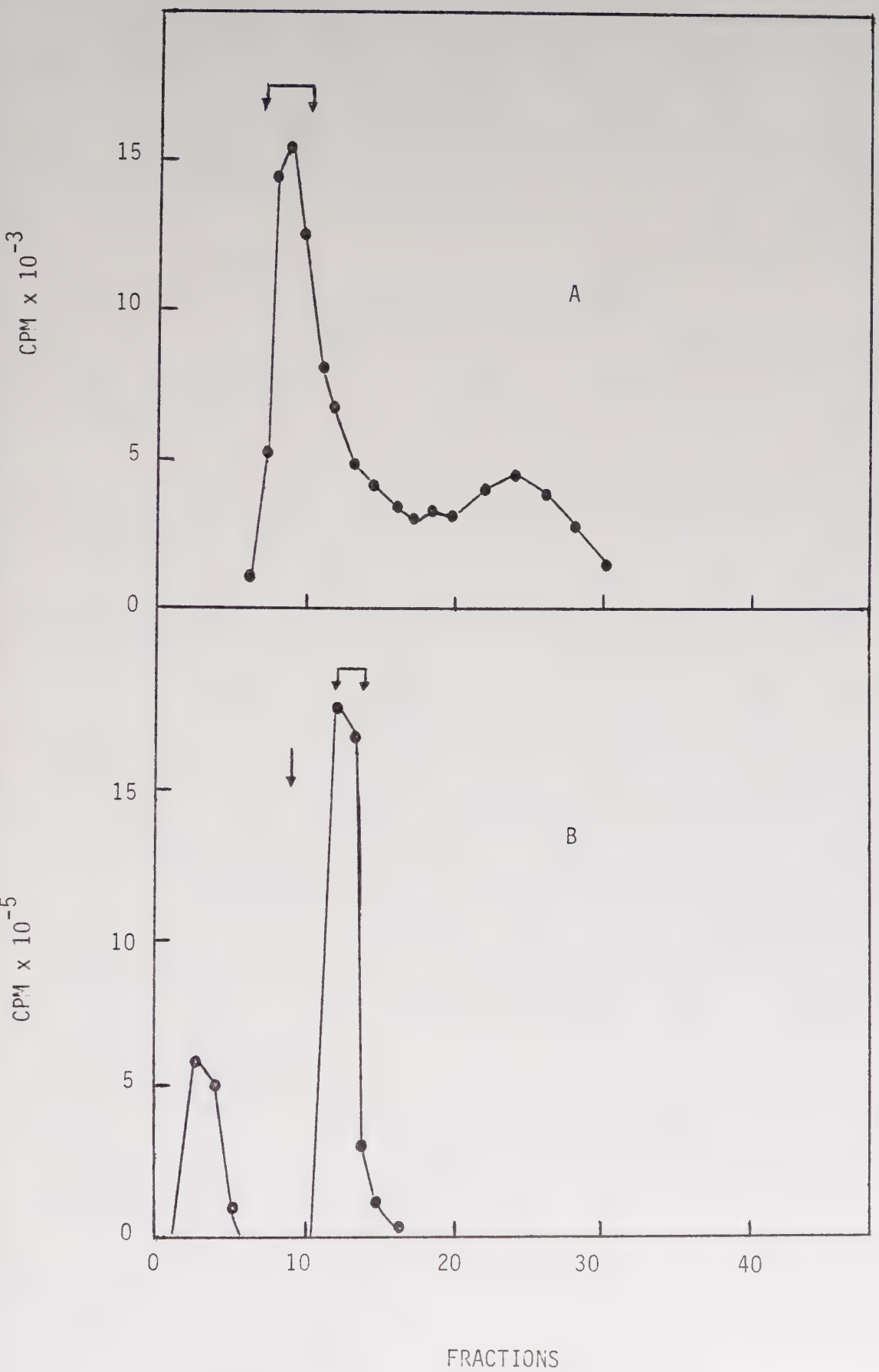
Le phage MS_2 qui nous a été donné est un mutant qui accumule la forme réplicative. Nous avons produit du phage en infectant la souche permissive E. Coli CR63 (Billeter et Weissmann, 1966) et préparé la forme réplicative par infection de la souche D_{11} non permissive (Billeter et al., 1966).

La souche D_{11} est cultivée à 37° dans un litre de milieu (Tryptone 1 %, glucose 0.1 %, NaCl 0.8 %, $CaCl_2$ 0.038 %, Vitamine B_1 0.001 %, jusqu'à une absorbance à 650 nm de 0.5 (2.10^8 bactéries/ml). Nous ajoutons 20 mCi de $H_3{}^{32}PO_4$, 10^{12} phages, et laissons poursuivre la culture pendant 40 min. Les bactéries sont recueillies par centrifugation (15 min à 8 000 x g), lavées deux fois par un tampon phosphate de potassium 0.05 M pH 7 et congelées une nuit.

Le culot bactérien est remis en suspension dans un tampon Tris-HCl 0.05 M pH 8, NaCl 0.1 M, EDTA 0.005 M, homogénéisé à 30° en présence de 1 % SDS et extrait trois fois par un volume égal de phénol saturé de tampon Tris-NaCl-EDTA. Le précipité d'acides nucléiques obtenu après addition d'éthanol est redissous dans un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.2, $MgCl_2$ 0.005 M puis digéré successivement par 25 µg/ml de DNAse I (40 min, 37°) et par 50 µg/ml de RNAse A (30 min, 20°) après ajustement du milieu en 1 x SSC. Après arrêt de la digestion enzymatique par le SDS, le RNA est précipité par l'éthanol, redissous en tampon 1 x SSC, extrait quatre fois par du phénol saturé de SSC puis précipité à nouveau. Le matériel est alors filté sur une colonne de Séphadex G-200 équilibré en SSC (Voir Fig. 2A). Le RNA issu de ce stade est

FIGURE 2 : *Purification de la forme replicative du MS_2.*

Le matériel issu des extractions phénoliques consécutives à la digestion par les nucléases est dissous dans 0.5 ml de SSC et filtré sur une colonne de Séphadex G-200 (0.8 x 20 cm) équilibré dans ce tampon. 5 µl de chaque fraction (volume 0.5 ml) sont dilués dans 2 ml d'eau et comptés par effet Cerenkov (A). Les fractions signalées par les flèches sont rassemblées et additionnées de deux volumes d'éthanol. Le RNA qu'elles contiennent, récolté par centrifugation, est redissous dans 0.5 ml de tampon phosphate 0.05 M pH 6.8, NaCl 0.5 M et chargé sur une colonne d'acide silicique-albumine méthylée (0.5 x 6 cm). La colonne est lavée par 5 ml de tampon phosphate-NaCl 0.5 M puis percolée par le tampon phosphate 0.05 M, NaCl 1 M. Les fractions de 0.5 ml sont comptées par effet Cerenkov (B). Le RNA élué par 1 M NaCl est précipité par l'éthanol redissous dans 1 ml de KCl 0.15 M et conservé à - 20°C.


CPM x 10^{-3}
15
10
5
0
A
CPM x 10^{-5}
15
10
5
0
B
0
10
20
30
40
FRACTIONS

dissous dans un tampon phosphate 0.05 M pH 6.8, NaCl 0.5 M et chromatographié sur une colonne contenant 2 ml d'acide silicique-albumine méthylée (Mandell et Hershey, 1960) (Okamoko et Kawade, 1963). Le RNA élué par le tampon 1 M NaCl (Voir Fig. 2B) est conservé en KCl 0.15 M à -20°.

Cette technique permet de préparer environ 1 µmole de $|^{32}P|$ dsRNA (ε molaire 6670) à 7.6 10^3 cpm/mole.

e) $|^{32}P|$ RNA nucléaire double chaîne.

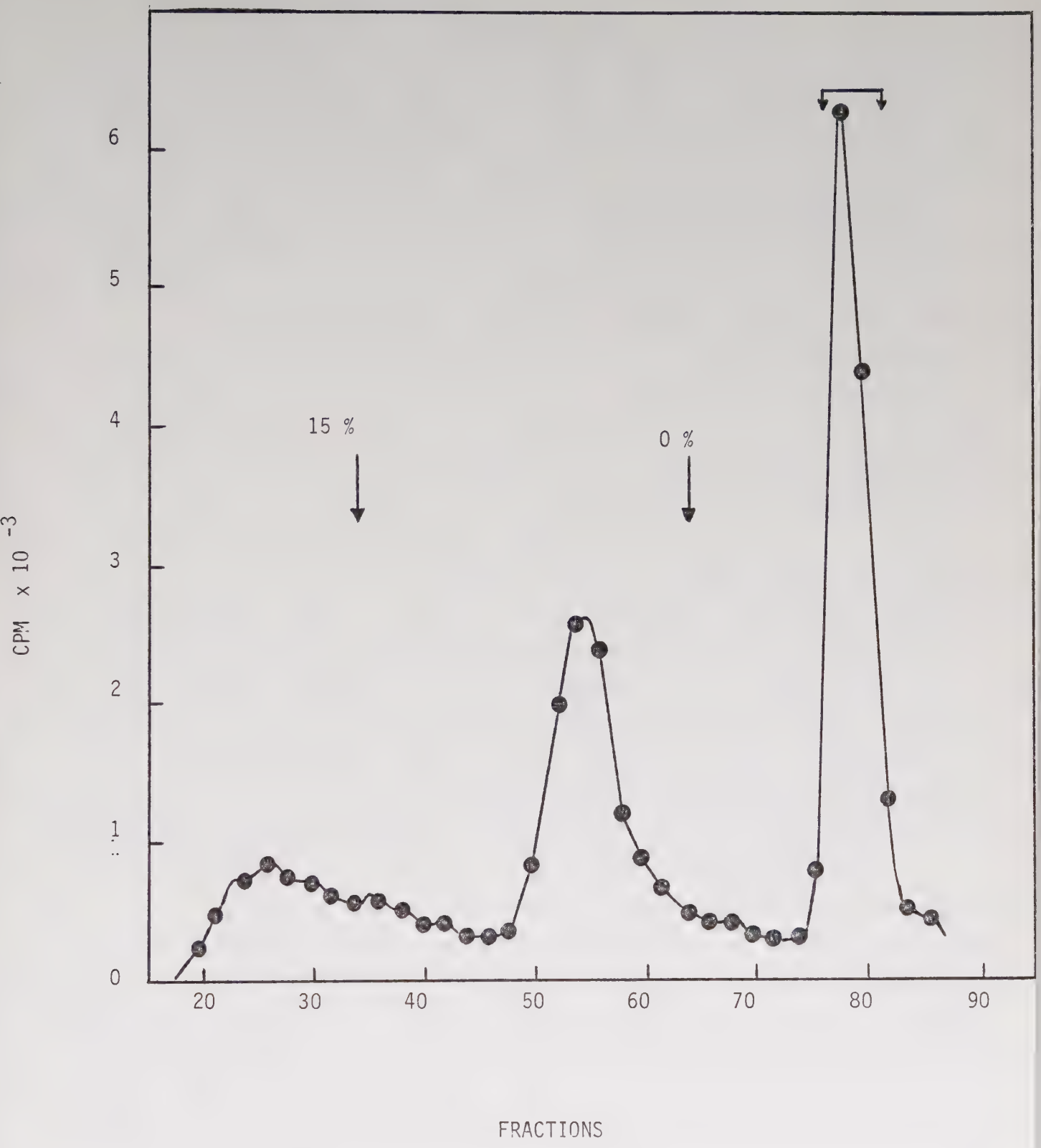
Nous avons séparé et purifié les régions double chaîne du hnRNA de cellules HeLa par la méthode de Robertson et al (1977) que nous résumons rapidement. Le RNA ainsi préparé a été nommé par la suite ds hnRNA.

Des cellules HeLa (souche S_3) sont remises en suspension à 3.10^6 cellules/ml dans 100 ml de milieu de Eagle modifié (Levintow et Darnell, 1960) et privé de phosphate. La suspension est additionnée d'actinomycine D (0.04 µg/ml) puis, après 20 min, de 100 mCi de $H_3\ ^{32}PO_4$. Les cellules sont maintenues trois heures dans ce milieu puis recueillies et lavées (Ducamp et Jeanteur, 1973).

Les noyaux préparés selon la méthode utilisée au laboratoire (Blanchard et al., 1977) sont mis en suspension dans un tampon Tris-HCl 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.5 M, $MgCl_2$ 0.005 M, $CaCl_2$ 10^{-4}M et digérés quelques minutes à 37° par 50 µg/ml de DNAse I. Après addition d'acétate de sodium pH 5.1, EDTA et SDS jusqu'aux concentrations respectives 0.05 M, 0.01 M et 0.5 % (p/v), cet homogénat est extrait deux fois à 65° par du phénol saturé de tampon acétate de sodium 0.05 M pH 5.1, EDTA 0.01 M et enfin deux fois par le mélange phénol-chloroforme 4 : 1 (v/v). Le RNA précipité par l'éthanol est redissous dans un tampon Tris-HCl 0.01 M pH 7.5, NaCl 0.1 M, $MgCl_2$ 0.005 M et traité successivement à 37° par : 100 µg/ml de DNAse I (40 min), 0.45 µg/ml de RNAse A (24 min), 2 U/ml de RNAse T_2 (20 min). Le RNA est ensuite extrait quatre fois par du phénol saturé de tampon TSE, précipité par l'éthanol, puis chromatographié sur une colonne de cellulose CF 11 selon les conditions décrites par Franklin (1966) (Voir Fig. 3).

FIGURE 3 : *Séparation des régions double chaîne du hnRNA.*

Le RNA extrait par le phénol saturé de tampon TSE est précipité par l'éthanol. Le culot, redissous dans le tampon TSE contenant 35 % d'éthanol, est appliqué sur une colonne de cellulose CF 11 (1 x 20 cm). La colonne au préalable a été lavée par 100 ml de TSE contenant 1 % de mercaptoéthanol puis par 250 ml de TSE contenant 35 % d'éthanol. Après la charge, la colonne est successivement lavée par le tampon TSE contenant 35 % d'éthanol, le tampon TSE contenant 15% d'éthanol, le tampon TSE sans éthanol. Les fractions sont de 1 à 2 ml et la radioactivité est comptée sur la fraction entière par l'effet Cerenkov. Le dsRNA est récupéré par précipitation éthanolique.


CPM x 10 -3
0
1
2
3
4
5
6
15 %
0 %
20
30
40
50
60
70
80
90
FRACTIONS

B - MESURE DE L'ACTIVITE RNAse D

Les dosages de routine ont généralement été réalisés avec le $|^3H|$ poly r(AU) ou le $|^3H|$ poly (rG) - poly (rC) comme substrats. Les conditions expérimentales sont très proches de celles décrites par Robertson et al. (1968) pour la RNAse III.

Dans 100 µl (volume final) de tampon Tris-HCl 0.02 M, pH 7.5, $^+NH_4Cl$ 0.1 M, $Mg(Ac)_2$ 0.01 M, EDTA 10^{-4} M nous introduisons 0.05 nmole de substrat et 1 à 20 µl de solution enzymatique. La digestion est faite à 37°.

Lorsque la période d'incubation, comprise entre 0 et 60 min est terminée, 80 µl de l'échantillon sont prélevés et déposés sur un filtre en fibre de verre GF/A préalablement imbibé de 10 µl de TCA 5 %. Les filtres sont disposés dans les cases d'un panier en téflon et lavés dans un bain de TCA 5 % froid. Ils sont ensuite séchés sous la lampe et comptés en mélange scintillant. L'essai témoin d'activité nulle est soit un échantillon incubé sans enzyme, soit un échantillon complet non incubé.

La différence de radioactivité entre le témoin et l'essai enzymatique représente donc la fraction de substrat dégradé par l'enzyme puisque devenu acido-soluble. Nous avons donc calculé et exprimé l'activité RNAse D en pour cent de substrat resté acido-précipitable. C'est ainsi que ce texte donne des courbes de cinétique décroissantes en fonction du temps d'incubation ou de la quantité d'enzyme présente. Cependant ce mode opératoire fait que, en cours de purification, le profil RNAse D dans un éluat de colonne se manifeste sous forme de pics inversés ; dans ce cas précis, nous avons porté sur les graphiques la fraction acido-soluble déduite par différence.

Nous avons été obligés parfois de fournir des activités spécifiques donc de chiffrer l'activité en nombres d'unités. Dans ce but nous avons opéré avec 0.1 nmole de substrat et en veillant à ce que la quantité d'enzyme ajoutée dégrade moins de 50 % du substrat présent. L'unité d'activité est la quantité d'enzyme qui rend acido-soluble 1 nmole de substrat en une heure dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. Comme on le verra par la suite on ne peut accorder qu'un sens très limité à ces déterminations.

+ Fréquemment la RNAse D se trouve dans un milieu contenant du sulfate d'ammonium 0.5 ou 0.8 M. La concentration totale en sel se trouve alors majorée et évolue suivant les cas entre 0.1 et 0.15 M.

C - *MESURES DES AUTRES ACTIVITES ENZYMATIQUES*

a) RNAse H

Cette activité est mesurée en tampon Tris-HCl 0.02 M, pH 8, KCl 0,1 M, $Mg(Ac)_2$ 0.01 M, 2-mercaptoéthanol 0.01 M sur du $|^{14}C|$ poly (rA) - poly (dT) comme substrat (Cathala et al., 1979). Le protocole expérimental est identique à celui décrit pour la RNAse D.

b) RNAses non spécifiques

1 - Sur les extraits cellulaires bruts, nous avons dosé ces activités en utilisant comme substrat des homopolymères non marqués poly (rC), poly (rU), poly (rG), poly (rA), extensivement dialysés contre des tampons à haute force ionique. La méthode est celle de Zimmerman et Sandeen (1965). L'échantillon à mesurer est incubé dans 0.5 ml de tampon Tris-HCl 0.03 M pH 8.2 en présence de 20 µg de substrat. Après incubation à 25° le polymère à l'exception du poly (rU) est précipité par l'acide perchlorique 5 % (concentration finale). La densité optique du surnageant, mesurée au λ max. correspondant, permet de calculer la quantité de substrat dégradé (exprimée en µmole par heure). Le poly(rU) est précipité par 70 % d'éthanol en milieu 0.1 M NaCl.

2 - En fin de purification de la RNAse D, nous utilisons des substrats radioactifs $|^{14}C|$ poly (rC) ou $|^{32}P|$ ssRNA, dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques à celles décrites ci-dessus pour la RNAse D.

c) Autres enzymes

Les DNAses sont estimées en prenant comme substrat du DNA de thymus (natif et dénaturé par la chaleur) à pH 7.6 et à pH 5. (Bartholeyns et al., 1975).

La phosphodiestérase est mesurée comme le décrit Laskowski (1967) en utilisant le bis paranitrophénylphosphate.

Les phosphatases sont estimées à pH 5, 7.2 et 9.6 avec le paranitrophénylphosphate comme substrat.

La 5' nucléotidase est mesurée par colorimétrie de l'ion phosphate libéré à partir du 5'AMP (Laskowki, 1967).

D - OBTENTION DES CELLULES D'ASCITES

La souche de cellules Krebs II est constamment entretenue dans la cavité intrapéritonéale de souris mâles par repiquage tous les 8 jours : 0.25 ml de liquide d'ascite prélevés à l'aide d'une seringue sur une souris malade sont injectés à une souris saine.

Pour une préparation d'enzyme nous injectons ainsi 40 souris qui sont sacrifiées une semaine après.

Le liquide d'ascite est récolté à température ambiante, légèrement dilué avec du tampon Tris-saline (Tris-HCl 0.035 M pH 7.6, NaCl 0.146 M) et centrifugé 10 min à 60 x g (Mathews et Korner, 1970). Après deux lavages dans ce tampon, les cellules sont finalement sédimentées à 500 x g de façon à connaître la quantité. 40 souris fournissent 60 à 80 ml de cellules.

E - ELECTROPHORESE DE PROTEINES

Pour les électrophorèses en gel acrylamide-SDS de type classique, les protéines de l'échantillon sont précipitées par le TCA (10 % final). Le culot est lavé deux fois par le mélange éther-éthanol 30:1 puis chauffé 5 min à 100° dans 50 µl de tampon Tris-HCl 0.05 M pH 6.8, EDTA 0.002 M, 2-mercapto-éthanol 1 %, SDS 10 %, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0.02 % (Blanchard et al., 1977). La migration est effectuée sur un gel en plaque (100 x 120 x 1.5 mm) à 10 % en acrylamide et surmonté par 1 cm de gel de concentration, dans un système discontinu (Matringe et Jacob, 1972). Les protéines sont colorées par le bleu de Coomassie 0.25 % en solution dans le mélange méthanol-acide acétique-eau (5/1/5) ; la décoloration est faite par immersion dans un bain d'acide acétique 7.5 %, méthanol 5 %. Le gel est séché sous vide pour être photographié et conservé (Maizel, 1971).

F - SEPARATION DES PRODUITS DE DIGESTION SUR COLONNE DE DEAE-SEPHADEX METHODE DE TENER (1967)

La DEAE-Séphadex A-25 est mise en suspension pendant 48 heures dans le tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.6, NaCl 0.1 M, urée 7 M (A-25) puis la colonne est montée (0.8 x 20 cm). Après lavage par 200 ml de tampon A-25, la colonne est chargée par les produits à séparer puis lavée avec 15 ml de tampon A-25 et enfin développée par 150 ml d'un gradient linéaire 0.05 à 0.5 M de NaCl dans le tampon A-25. A la fin du gradient la colonne est lavée par du tampon A-25 1 M NaCl puis par de la soude 0.1 N. Le débit, régularisé par une pompe, est de 0.8 ml/min. Les fractions (1.2 ml) sont comptées par effet Cerenkov pour les RNA marqués sur le phosphate ou comptés en scintillation après addition de 0.1 ml d'acide formique et 7.5 ml de scintillant Triton pour les substrats $|^{3}H|$ et $|^{14}C|$.

G - AUTRES METHODES

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry après précipitation par le TCA (Linn et Lehman, 1965).

Les comptages de radioactivité sont effectués dans un scintillateur Intertechnique SL-30. En solution, les échantillons marqués $|^{32}P|$ sont comptés par effet Cerenkov. En solution, les échantillons marqués au $|^{3}H|$ ou $|^{14}C|$ sont comptés en scintillation après addition du mélange composé de PPO 0.55 %, diméthyl-POPOP 0.01 %, dissous dans le toluène contenant 20 % de Triton X-100. Les filtres en fibre de verre sont comptés après séchage dans 5 ml de toluène contenant 2.5 % de PPO et 0.15 % de diméthyl-POPOP.

C H A P I T R E I

P U R I F I C A T I O N

Le but dans une purification de protéine est évidemment d'obtenir celle-ci à l'état homogène. Dans le cas présent et pour diverses raisons, cet objectif nous est apparu, non pas inaccessible, mais relativement éloigné. Nous avons donc défini d'autres critères. Si la RNAse D constitue bien une enzyme dite de "processing", nous devons en fournir une préparation au moins exempte de nucléases susceptibles d'ajouter des effets indésirables. Or, si les polymères utilisés pour doser la RNAse D sont très robustes vis-à-vis des ssRNAses, il n'en est pas de même pour les substrats naturels que l'on a coutume d'évoquer. En effet le RNA préribosomal 45S, le hnRNA, les messagers viraux sont des molécules extrêmement fragiles et vulnérables.

Nous avons donc fixé pour objectif l'élimination impérative des phosphodiestérases et des ssRNAses. Cette tâche n'est déjà pas si facile ; en effet le cytoplasme de cellules d'ascites exhibe au moins 2000 fois plus d'activité sur un substrat simple chaîne que double chaîne ; de plus l'ensemble de ces RNAses ont un comportement très voisin sur les supports chromatographiques dont on dispose. Le protocole que nous proposons ci-après est celui que nous avons retenu au terme de nombreux essais. Nous citerons tout de même pour mémoire les expériences infructueuses ou peu satisfaisantes.

A - PROTOCOLE

a) Extrait cellulaire total

Les cellules lavées sont transférées dans un homogénéiseur de Dounce et remises en suspension à 0° dans deux fois leur volume d'un tampon hypotonique Tris-HCl 0.01 M pH 7.5, KCl 0.01 M, $Mg(Ac)_2$ 0.0015 M. Après un repos de 10 min elles sont cassées par 25 coups de piston. Le microscope à contraste de phase montre que 70 à 80 % des cellules présentes sont cassées. Cet homogénat est réparti dans les tubes du Rotor Ti 70, rendu 0.4 M en NaCl puis fortement agité. (Le microscope montre qu'il ne subsiste à ce stade aucun noyau ou cellule). Une centrifugation de 105 min à 260 000 x g permet d'obtenir un surnageant limpide que nous prélevons à la pipette en évitant au maximum de prendre la pellicule de graisse qui surnage. Le volume de cet extrait brut est de 100 à 150 ml.

b) Phosphocellulose n° 1

Aussitôt après son obtention, l'extrait brut est additionné de PMSF 0.1 M pour avoir 10^{-4}M et chargé sur une colonne de phosphocellulose (5 x 12 cm) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0.03 M pH 7.5, EDTA 10^{-3}M, 2-mercaptoéthanol 6.10^{-3}M, glycérol 10 % v/v (Tampon PC). Après lavage, la colonne est éluée par 1600 ml d'un gradient linéaire en $SO_4(Am)_2$ 0 à 0.8 M dans le tampon PC molaire en $SO_4(Am)_2$ (Voir Fig. 4).

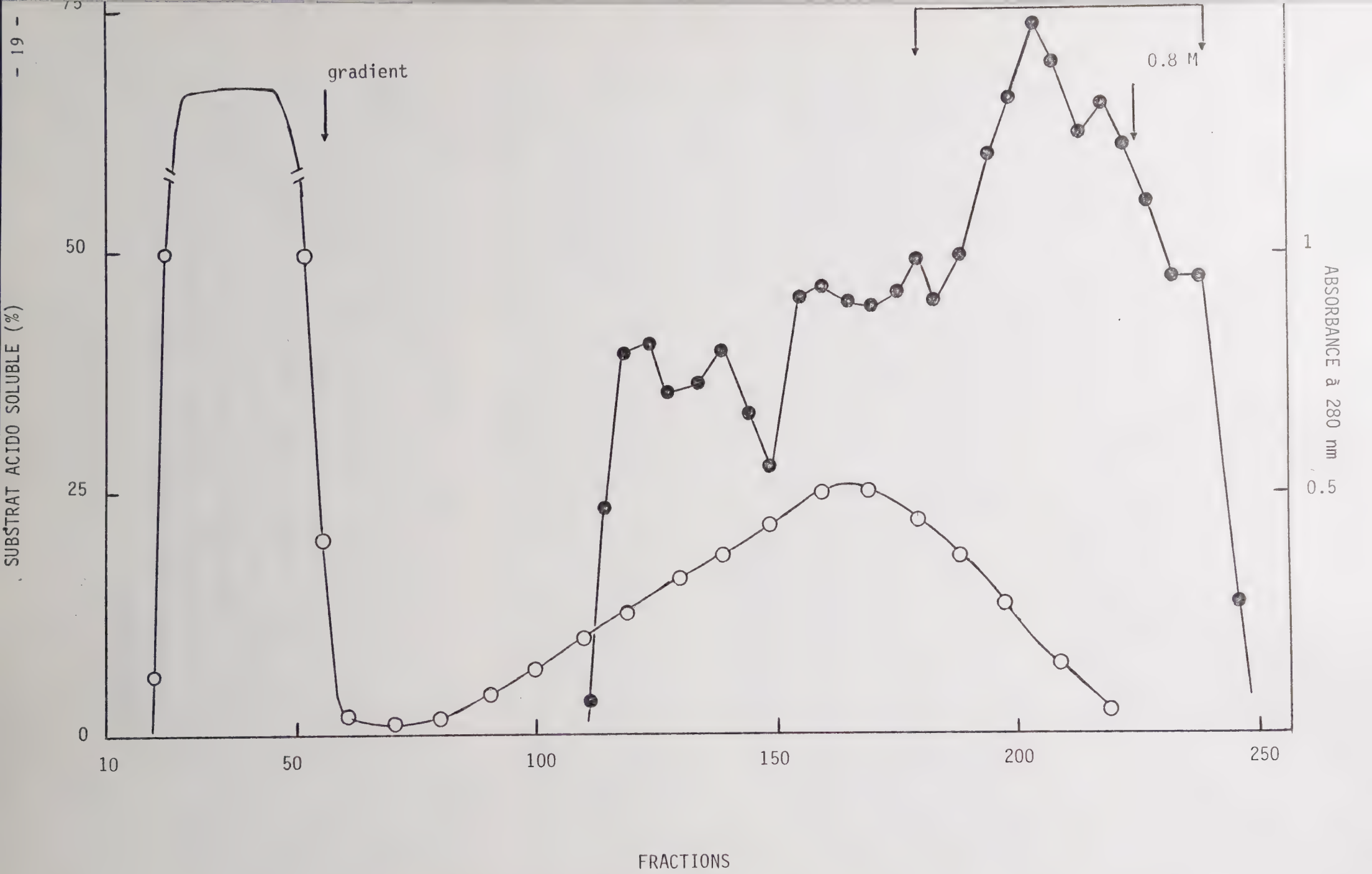
On ne détecte pas de RNAse D dans la charge et le lavage de la colonne. Dans le gradient le profil d'activité est toujours très étalé et peut se diviser grossièrement en deux zones. La première, où l'activité n'est pas très grande, coïncide avec le maximum de densité optique à 280 nm. Le dosage a montré qu'une activité RNAse H (H_2) est éluée dans cette région conformément aux résultats antérieurs (Cathala et al., 1979). La deuxième, où l'activité apparaît plus importante, se situe lorsque la densité optique décroît et s'annule. Généralement la RNAse D n'est entièrement éluée qu'avec la solution molaire en sulfate d'ammonium. Les fractions de la zone 2 sont rassemblées (500 à 600 ml) et l'ensemble est additionné de 39 mg/ml de $SO_4(Am)_2$ (60 % de saturation), puis laissé à 4° sous agitation lente pendant une nuit. Le précipité de protéines est sédimenté par centrifugation (20 min à 20 000 x g).

FIGURE 4 : *Purification de la RNAse D - 1ère chromatographie sur phosphocellulose - (5 x 12 cm).*

La phosphocellulose est traitée à la soude 0.5 N, à l'acide HCl 0.5 N puis ajustée à pH 7.5 sous le pH mètre à l'aide de KOH 6 N (Burgess et Travers, 1971). La résine est ensuite prééquilibrée par décantation avec du tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 puis versée dans la colonne et lavée avec trois litres de tampon PC. L'extrait brut (150 ml contenant 3 à 4 g de protéines) est chargé sur la colonne puis celle-ci est lavée par gravité avec le tampon PC plus PMSF 10^{-4}M jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm ait disparu. L'élution est alors réalisée par un gradient de $SO_4(Am)_2$ de 0 à 0.8 M dans le tampon PC (volume 1600 ml). Ensuite la colonne est lavée par du tampon PC molaire en $SO_4(Am)_2$. Le débit, régularisé par une pompe, est de 18 ml/h et les fractions de 9 ml. L'activité RNAse D est mesurée en incubant le $|^3H|$polyr(AU) 30 min à 37° avec 5 µl d'éluat. Les fractions 180 à 240 sont mélangées et la solution (550 ml) est additionnée de 210 g de $SO_4(Am)_2$ et laissée sous agitation une nuit. Le précipité est recueilli par centrifugation (20 min à 20 000 x g), redissous et équilibré contre le tampon DE par dialyse.

●——● Activité RNAse D exprimée en % de substrat rendu acido soluble.

○——○ Densité optique à 280 nm.


gradient
0.8 M
SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
ABSORBANCE à 280 nm
0
25
50
75
0.5
1
10
50
100
150
200
250
FRACTIONS

c) DEAE-Cellulose

Le précipité est redissous dans un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, NH_4Cl 5.10^{-3}M, 2-mercaptoéthanol 6.10^{-3}M, PMSF 10^{-4}M, glycérol 10 % v/v (tampon DE) et dialysé une nuit contre ce tampon. Un fin précipité se forme dans le boyau en fin de dialyse. Bien qu'un dosage direct n'ait pas montré d'une manière nette que ce précipité contenait des quantités notables de RNAse D nous avons trouvé, au fil des préparations, qu'il était préférable de ne pas l'éliminer. En conséquence la dialyse n'est jamais prolongée au-delà de 15 h et la totalité du dialysat est chargé sur une colonne de DEAE-cellulose (2 x 18 cm) (Voir Fig. 5). Après lavage par le tampon DE, l'élution -lorsqu'elle est réalisée- est faite par des solutions de tampon DE contenant 0.1 M ou 0.2 M KCl.

Toutes les colonnes de DEAE-cellulose ont montré sans équivoque que l'enzyme n'est pas fixée sur cet échangeur. Cependant le dosage d'activité sur un éluat 0.1 M KCl a souvent montré sur le $|^3H|$ poly r(AU) une activité extrêmement labile mais non négligeable. Nous aurons l'occasion plus loin de reparler de ce problème. Toutes les fractions contenant l'activité RNAse D sont rassemblées.

d) Phosphocellulose n° 2

La fraction obtenue ci-dessus (30 à 50 ml) est passée sur une nouvelle colonne de phosphocellulose (0.5 x 6 cm) équilibrée par le tampon PC. Cette 2ème colonne est développée tout comme la 1ère à l'exception du volume de gradient qui est de 50 ml. (Voir Fig. 6). A nouveau nous retrouvons un profil d'activité en deux parties dont une coïncide encore avec le maximum d'absorption à 280 nm et contient de la RNAse H_2 non éliminée à la 1ère chromatographie. Les fractions de la 2ème partie du pic sont mélangées et équilibrées par dialyse à la concentration 0.1 M en $SO_4(Am)_2$.

e) Phosphocellulose n° 3

Après l'équilibration la solution enzymatique est passée à travers une dernière colonne de phosphocellulose (0.5 x 3 cm) qui est éluée avec du tampon PC 0.8 M en $SO_4(Am)_2$ (Voir Fig. 7). La RNAse D est entièrement retenue sur la colonne et se trouve concentrée par cette opération. Les fractions contenant l'activité sont conservées séparément à 0°.

Figure 5 : *Purification de la RNAse D - Chromatographie sur DEAE-Cellulose -*

La cellulose DE 52 est lavée par décantation avec élimination des fines par du tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.5. Elle est ensuite versée dans la colonne et lavée avec 600 ml de tampon DE. Le dialysat issu de la 1ère phosphocellulose (30 ml contenant 9 mg de protéine) est passé sur la colonne qui est ensuite lavé par le tampon DE. L'activité RNAse D est mesurée sur 10 µl de chaque fraction (1 ml) incubée pendant 30 min à 37°C avec le $|^{3}H|$ poly r(AU). Les fractions 6 à 65 sont mélangées.

●——● Activité RNAse D

○——○ Densité optique à 280 nm

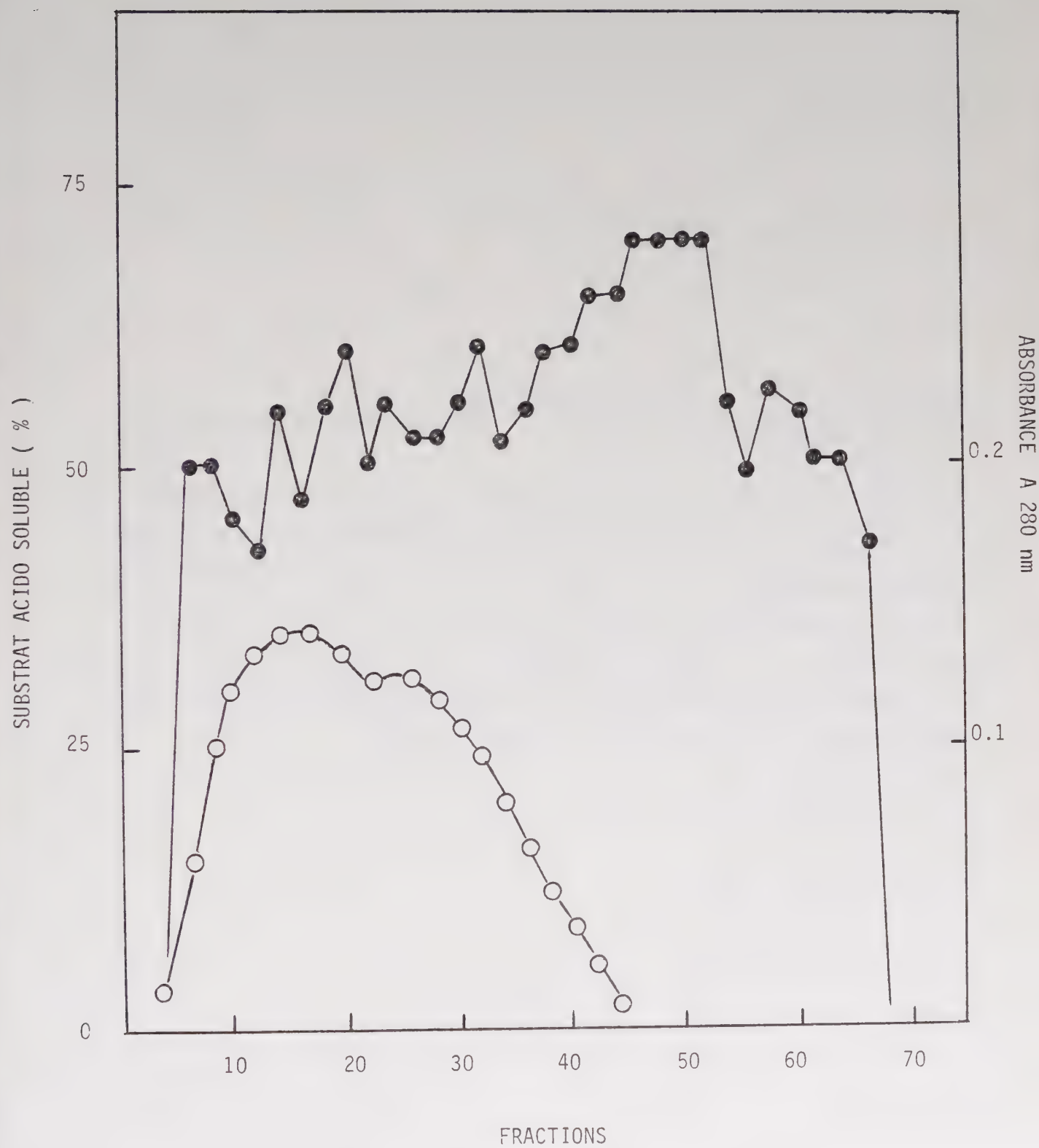

SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
75
50
25
0
ABSORBANCE A 280 nm
0.2
0.1
10
20
30
40
50
60
70
FRACTIONS

FIGURE 6 : *Purification de la RNAse D - 2ème chromatographie sur phospho-cellulose (0.5 x 6 cm).*

La colonne est préparée comme dans la figure 4. La fraction non retenue sur DEAE-cellulose (50 ml, 4.4 mg de protéines) est passée à travers la résine avec un débit de 2 ml/h. Aussitôt après, l'élution est réalisée par 50 ml de gradient 0 - 08 M de $SO_4(Am)_2$ dans le tampon PC. Les fractions collectées (0.5 ml) sont lues à 280 nm pour le profil des protéines. Les activités RNAse D et RNAse H et ssRNAse sont mesurées en incubant 5 µl pendant 30 minutes à 37° sur le $|^3H|$ poly r(AU) le $|^{14}C|$ poly(rA)-poly(dT) et le $|^{32}P|$ ssRNA respectivement. Les fractions 42 à 80 sont mélangées.

o——o Densité optique à 280 nm

●——● Activité RNAse D

▲- - - -▲ Activité RNAse H_2

◑——◑ Activité ss RNAse

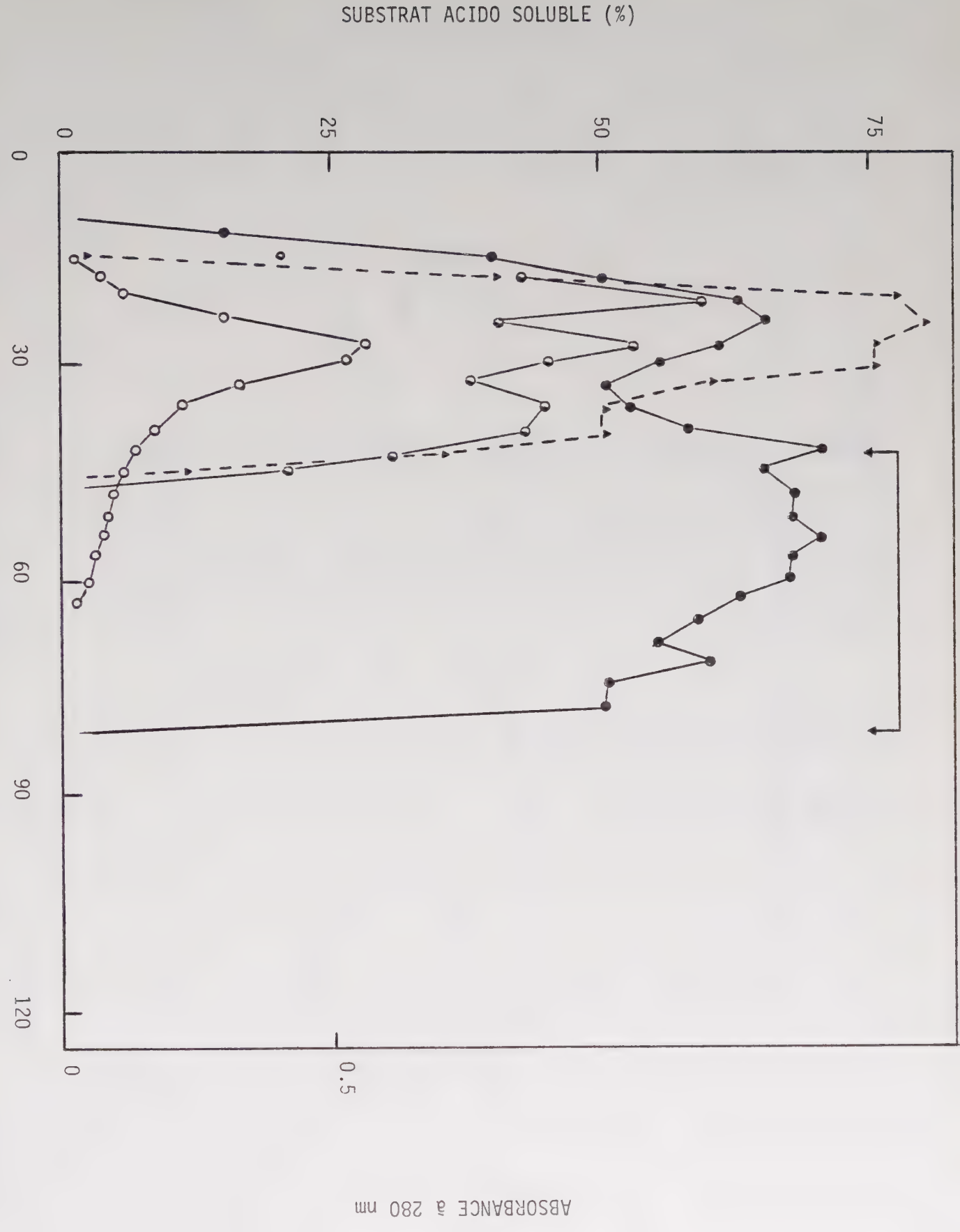
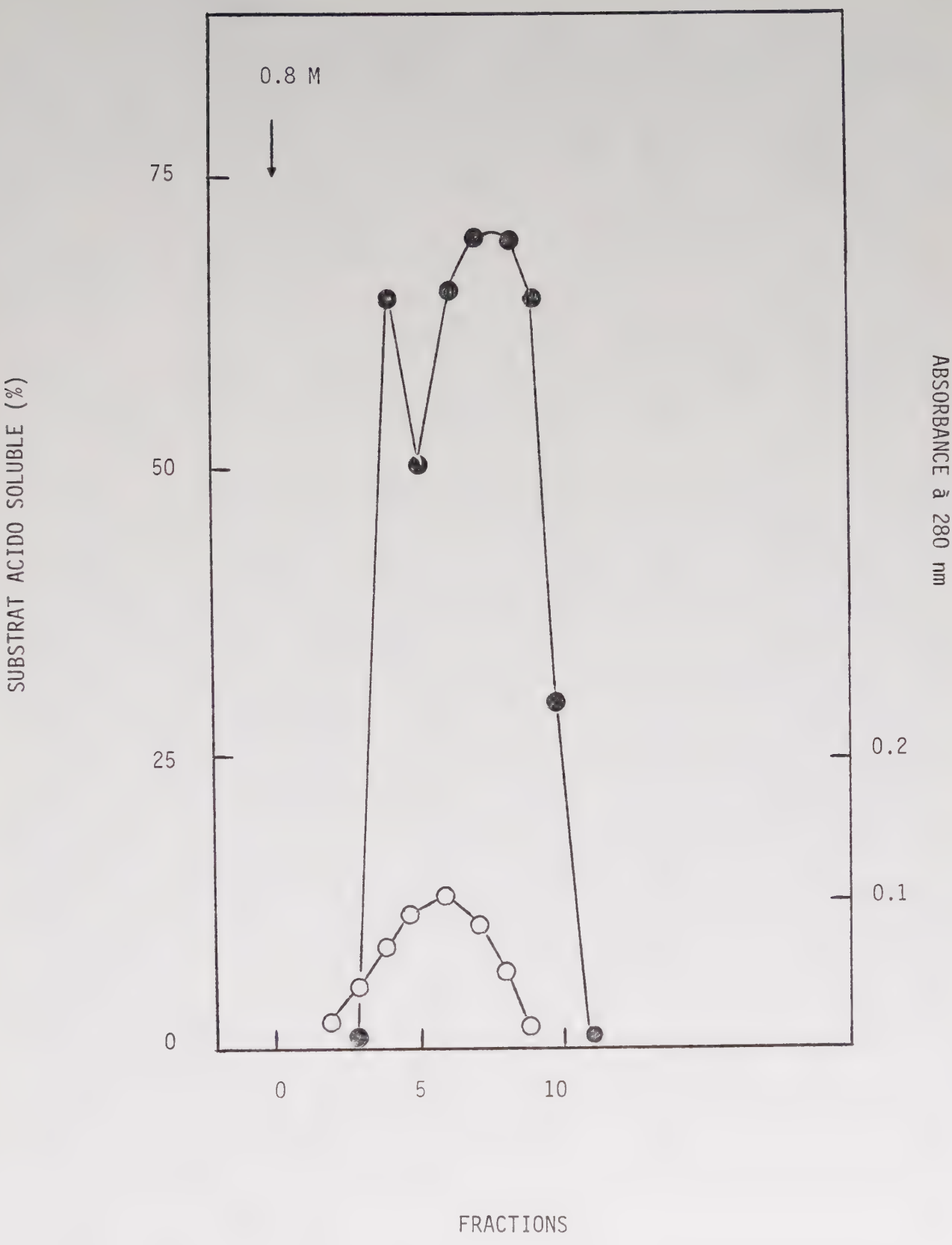

SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
0
25
50
75
0
30
60
90
120
0
0.5
ABSORBANCE à 280 nm

FIGURE 7 : *Purification de la RNAse D - Concentration de l'enzyme sur phosphocellulose (0.5 x 3 cm) -*

La phosphocellulose préparée comme dans la figure 4 est percolée à 1 ml/h par la fraction issue du stade précédent (19 ml, 1.2 mg de protéines). La RNAse D est éluée par du tampon PC 0.8 M en $SO_4(Am)_2$. L'activité est mesurée avec 2 µl de chaque fraction (0.5 ml) sur le poly $|^3H|$ poly r(AU) 30 min, 37°C.

O——O Densité optique à 280 nm

●——● Activité RNAse D


0.8 M
75
50
25
0
0
5
10
0.2
0.1
SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
ABSORBANCE à 280 nm
FRACTIONS

B - *RESULTATS ET DISCUSSION*

a) Bilan

Dans la préparation, illustrée par les différents graphiques, nous obtenons les résultats suivants pour les protéines totales :

Extrait brut	*3000 mg*
PC_I *après précipitation au* $SO_4(Am)_2$	*9*
DEAE-cellulose	*4,4*
PC_2	*1,1*

Nous n'avons fait que des bilans protéiques partiels au stade PC_3. Ces valeurs qui représentent la purification en terme de protéines globales sont reproductibles d'une préparation à l'autre.

Il n'est pas aussi facile de montrer la variation concomittante de l'activité spécifique. En effet il est strictement impossible de détecter la RNAse D au niveau d'un extrait brut cellulaire total (ou d'un précipité au $SO_4(Am)_2$ qui en serait issu). Notons que dans nos premières purifications nous mesurions une faible activité au niveau du S-30 qui parfois était accrue dans le surnageant post-ribosomal (cf. article 1). Nous pensons que ce phénomène est dû à la présence d'un inhibiteur -on sait qu'il en existe pour la RNAse A (Roth, 1967) (Blackburn et al., 1977)- ou tout simplement à la grande quantité d'acides nucléiques qui rentrent en compétition avec le substrat radioactif lors du dosage. La mesure de l'activité initiale de la RNAse D reste donc inaccessible. Après la 1ère phosphocellulose l'activité est détectée dans le gradient sans aucun problème. Malheureusement à ce stade nous avons montré (cf. étude des produits de digestion) qu'une exonucléase se surajoute à la RNAse D. Ceci a pour effet de majorer sensiblement l'activité RNAse D, probablement parce que l'exonucléase prend comme substrat les fragments libérés par la RNAse D, lesquels deviennent plus rapidement acido-solubles. Cette exonucléase est séparée de la RNAse D par la colonne de DEAE-cellulose où elle est retenue. Dans ces conditions il nous paraît difficile de faire un bilan d'activité. Nous nous limiterons donc à ceci : au stade DE la RNAse D a une activité spécifique de 50 à 60 U/mg. La 2ème colonne de phosphocellulose multiplie ce chiffre par 3 à 4. A la fin du cycle de purification la préparation de RNAse D présente donc une activité spécifique estimée sur le $|^3H|$

poly r(AU) de 200 à 220 U/mg. Précisons encore que ce chiffre exclut l'activité exonucléase signalée ci-dessus.

Nous avons essayé la technique de renaturation en gel d'acrylamide décrite par Huet et al. (1978) et utilisée avec succès pour la RNAse H_2 (Cathala et al., 1979) pour tenter d'associer la RNAse D à une bande de protéine visualisée par coloration et juger ainsi du degré de pureté de la préparation. Rappelons que dans cette technique, le substrat radioactif est inclus dans le gel, l'enzyme -si elle se renature après élimination du SDS- dégrade le substrat, qui se signale alors par une bande plus claire à l'autoradiographie du gel. Les premiers essais de renaturation en gel se sont révélés négatifs (J. Huet Communication personnelle) et les modifications expérimentales que nous avons essayé d'introduire ont échoué. Cependant avec une préparation, il a été obtenu au laboratoire un résultat intéressant que l'on peut voir Fig. 8. Sur l'autoradiographie nous voyons une zone nettement plus sombre que le fond (+) et qui correspond à un groupe de trois protéines dont le PM évalué par rapport aux protéines de référence est compris entre 24 et 28 000. Vraisemblablement il y avait à cet emplacement dans le gel un ou plusieurs polypeptides qui ont fixé et concentré $|^{32}P|$ poly r(AU). Il n'est pas déraisonnable de supposer que ceci pourrait être le fait de l'enzyme ou de ses sous-unités, de multiples causes pouvant expliquer l'absence de récupération de l'activité hydrolytique. Malgrè tout, ceci reste une hypothèse et cette technique ne permet malheureusement pas de répondre à nos préoccupations.

La littérature montre que la RNAse III de E. Coli est obtenue au stade pratiquement homogène (Darlix, 1975) (Dunn, 1976) (Mirenbaum et al., 1978) mais que les préparations des différentes RNAse D décrites à ce jour sont encore loin de cet état (Ohtsuki et al., 1977) (Shanmugan, 1978) (Saha et Schlessinger, 1978) (Grummt et al., 1979).

Autres activités contaminantes. Les essais d'activité de DNAses, phosphatases et phosphodiestérases se sont révélés négatifs sur les fractions les plus purifiées.

En ce qui concerne les hybridases, c'est la RNAse H_2 retenue sur phosphocellulose, non retenue sur DEAE, qui peut contaminer la RNAse D. Le

---

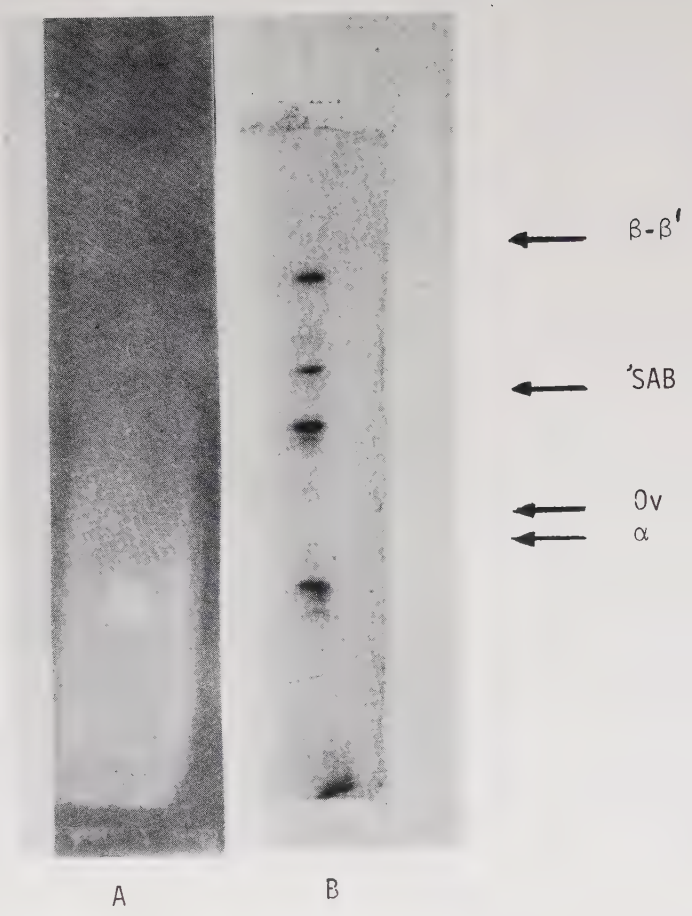
(+) Le résultat de l'autoradiographie a été inversé par la photographie.

FIGURE 8 : *Détection de l'activité RNAse D après migration électrophorétique gel-SDS.*

L'électrophorèse est réalisée comme il est décrit dans les "Méthodes" sauf que, conformément à la technique de Huet et al (1978), le $|^{32}P|$ poly r(Au) (2.5 nmoles, 7 10^5 cpm) est inclus dans le gel de séparation et l'échantillon est déposé sur le gel dans un tampon Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 3 %, 2-mercaptoéthanol 5 %, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0.01 %. Après migration le gel est traité comme il est décrit dans la technique originale (Huet et al, 1978) à l'exception de la renaturation qui est faite à 25° pendant 24 heures dans un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.1 M, $Ac(Mg)_2$ 0.01 M, EDTA 0.001 M avec trois changements de bain.

A- Résultat de l'autoradiographie. (Film Kodak X-Omat S, exposition 48 h) on observe une bande sombre sur un fond gris (la photographie ayant inversé le résultat de l'autoradiographie).

B- Résultat de la coloration par le bleu de Coomassie.


β-β'
'SAB
Ov
α
A
B

résultat final dépend essentiellement de la façon plus ou moins sévère dont a procédé pour l'éliminer aux stades PC_1 et PC_2. Cependant, c'est toujours dans les premières fractions du pic PC_3 que l'on retrouve le reliquat de RNAse H_2. Au-delà nous avons généralement observé que les conditions expérimentales qui donnent 50 % de dégradation sur le $|^3H|$ poly r(AU) ne donnent pas d'hydrolyse significative sur le $|^{14}C|$ poly r(A) - poly (dT).

Pour le cas des ssRNAses, la technique de Zimmerman et Sandeen (1965) ne permet pas de détecter d'activité sur les fractions issues de PC_2 et PC_3 même avec des temps d'incubation supérieurs à 90 min. Nous avons donc utilisé le $|^3H|$ poly (rC) comme substrat dans des conditions expérimentales identiques à celles du dosage de la RNAse D. La Fig. 6 montre la distribution de l'activité ssRNAse le long du gradient d'élution d'une colonne PC_2. Nous voyons qu'elle coïncide avec l'activité RNAse H_2 et, partiellement, avec l'activité RNAse D. Ce phénomène a constamment été observé et persiste encore au stade PC_3.

Il faut donc supposer que l'élimination des ssRNAses n'a pas été totale ou que la RNAse D exerce une activité sur le poly (rC) ; ceci n'est pas exclu car ces homopolymères ne sont pas dénués de structure secondaire et peuvent constituer de mauvais substrats (H.D. Robertson, communication personnelle). Ce problème decontamination par les ssRNAses a été envisagé au chapitre suivant (cf. spécificité de substrat) en utilisant après dénaturation le $|^{32}P|$ RNA de phage ϕ6. Sans donner ici tous les résultats, précisons que nous n'avons jamais pu obtenir d'activité nulle sur le ssRNA. Cela peut-il exister ? De toute évidence les autres expérimentateurs n'ont pu également résoudre ce problème car les travaux publiés sur la RNAse D mentionnent des activités sur le ssRNA non négligeable (Ohtsuki et al., 1977) (Shanmugan, 1978) (Saha et Schlessinger, 1978) (Hall et Crouch, 1977).

Stabilité de la RNAse D. En cours de purification elle nous semble bonne. Néanmoins il paraît indispensable de partir d'une quantité de cellules relativement grande, d'amorcer la 1ère phosphocellulose le jour même de l'homogénéisation, de ne pas laisser l'enzyme en solution diluée et de la concentrer après le stade DE au moyen de la phosphocellulose et non par précipitation.

Après purification la stabilité apparaît d'autant meilleure que la quantité globale de protéines présentes est plus grande. Elle est bonne pendant 2 à 3 mois à 0°. Le problème de la stabilisation de l'enzyme n'a pas été

réellement approfondi mais précisons que l'addition de glycérol, sérum albumine, PMSF, DTT, ne modifie pas sensiblement la conservation.

b) Justification du protocole de purification adopté

Une précipitation au sulfate d'ammonium à 60 % de saturation réalisée sur l'extrait brut a été finalement rejetée car elle n'élimine pas de protéines et le précipité obtenu, difficile à remettre en suspension, flocule pendant la charge de la phosphocellulose.

Nos premières méthodes de purification utilisaient la CM-cellulose où l'enzyme est retenue à pH 7.2 et peut être éluée à partir de 0.06 M en KCl (cf article 1). Un résultat analogue est obtenu sur SP-Séphadex. Nous estimons cependant que la phosphocellulose est largement supérieure vu l'énorme affinité que l'enzyme présente pour elle et la stabilité qu'elle lui confère.

Les supports chromatographiques octyl-sépharose et phényl-sépharose qui font intervenir les interactions de type hydrophobes ont été essayées au stade analytique. A l'issu du stade PC_1 une fraction contenant l'activité RNAse D est rendue 1 M en $SO_4(Am)_2$ et chargée sur chacune des deux colonnes (0.5 x 3 cm). L'élution est faite par paliers avec du tampon PC 0.4 M en $SO_4(Am)_2$, du tampon PC, du tampon PC contenant 50 % d'éthylèneglycol. La RNAse D est retenue sur chacun des deux supports et a été éluée uniquement à partir du phénylsépharose par le tampon PC dépourvu de $SO_4(Am)_2$. Malheureusement cette activité s'est réduite à zéro dans les 24 heures. Ces supports sont peut-être utilisables avec des quantités plus importantes de matériel, mais à condition de résoudre le problème de la stabilité de l'enzyme.

Colonnes d'affinité. Nous avons fondé de grands espoirs sur ces techniques et essayé à maintes reprises de les intégrer dans le protocole de purification. Trois types ont été envisagés.

Le Bleu dextran-sépharose. On sait que le Bleu dextran grâce à son chromophore le bleu cibacron interagit avec les enzymes qui utilisent les nucléotides et peut être utilisé en colonnes d'affinité (Thompson et al., 1975) (Brissac et al., 1976) (Wilson, 1976). Nous avons couplé le Bleu dextran au sépharose 4B selon la méthode de March et al. (1974). La RNAse D est retenue sur Bleu dextran-sépharose en présence de 0.05 M KCl. L'élution de la colonne

par palier de concentrations (0.1 M, 0.25 M, 0.5 M KCl) montre que l'enzyme se désorbe chaque fois partiellement. L'application d'un gradient de concentration en KCl (0.05 M à 0.5 M) redonne le même phénomène à savoir que l'activité RNAse D s'émiette tout au long de l'élution. Cette chromatographie s'est révélée totalement inefficace dans la séparation des RNAses H et D.

Aminophényl UMP-agarose. Le 5'-4-Aminophényl-phosphoryl uridine 2' (3') phosphate est un inhibiteur de la RNAse A et peut être utilisé en chromatographie d'affinité après couplace à l'agarose. (Wilchek et Goreki, 1969). En tampon Tris-HCl 0.01 M pH 7 nous n'avons pas réussi à fixer l'enzyme responsable de l'activité sur le poly (rC). La RNAse D est par ailleurs légèrement retenue sur ce support si bien que les activités restent non séparées à l'issue de cette colonne.

Poly (rI) - poly (rC) agarose. C'est a priori le meilleur support d'affinité et Dunn (1976) montre que son utilisation lui permet de purifier la RNAse III de E. Coli jusqu'à l'homogénéité. Nous avons essayé de transposer cette technique à la RNAse D. La colonne de gel (0.5 x 2 cm) est lavée par un tampon Tris-acétate 0.02 M pH 7.6, NH_4Cl 0.5 M, EDTA 0.001 M, glycérol 5 % (tampon IC). La solution contenant l'enzyme est amenée à ces conditions et chargée sur la colonne qui est ensuite éluée avec du tampon IC 1 M puis 2 M NH_4Cl. La RNAse III éluée à cette dernière concentration montre une bande en gel acrylamide-SDS (Dunn, 1976). Le poly r(I) - poly r (C) agarose que nous avons utilisé est soit un produit commercial, soit un produit préparé au laboratoire selon la technique de Wagner et al. (1971). D'une manière générale nous avons observé que la rétention de la RNAse D est mauvaise sinon nulle. Dans tous les cas le peu d'enzyme fixée est éluée par le tampon 1 M NH_4Cl (Voir Fig. 9). Une électrophorèse en gel-SDS réalisée sur cette fraction ne montre pas de très grands progrès dans la purification si bien que la spécificité de fixation nous est apparue relativement illusoire.

Nous avons gardé de ces expériences l'impression que ces colonnes d'affinité fonctionnaient en fait comme des échangeurs d'ions peu commodes à utiliser. La désorption spécifique de l'enzyme par un dsRNA ne peut être envisagée puisque sa présence inhiberait toute réaction enzymatique ultérieure par compétition.

Filtration sur gel. Elle peut présenter un double intérêt : la purification, l'estimation du poids moléculaire. Nous avons essayé les

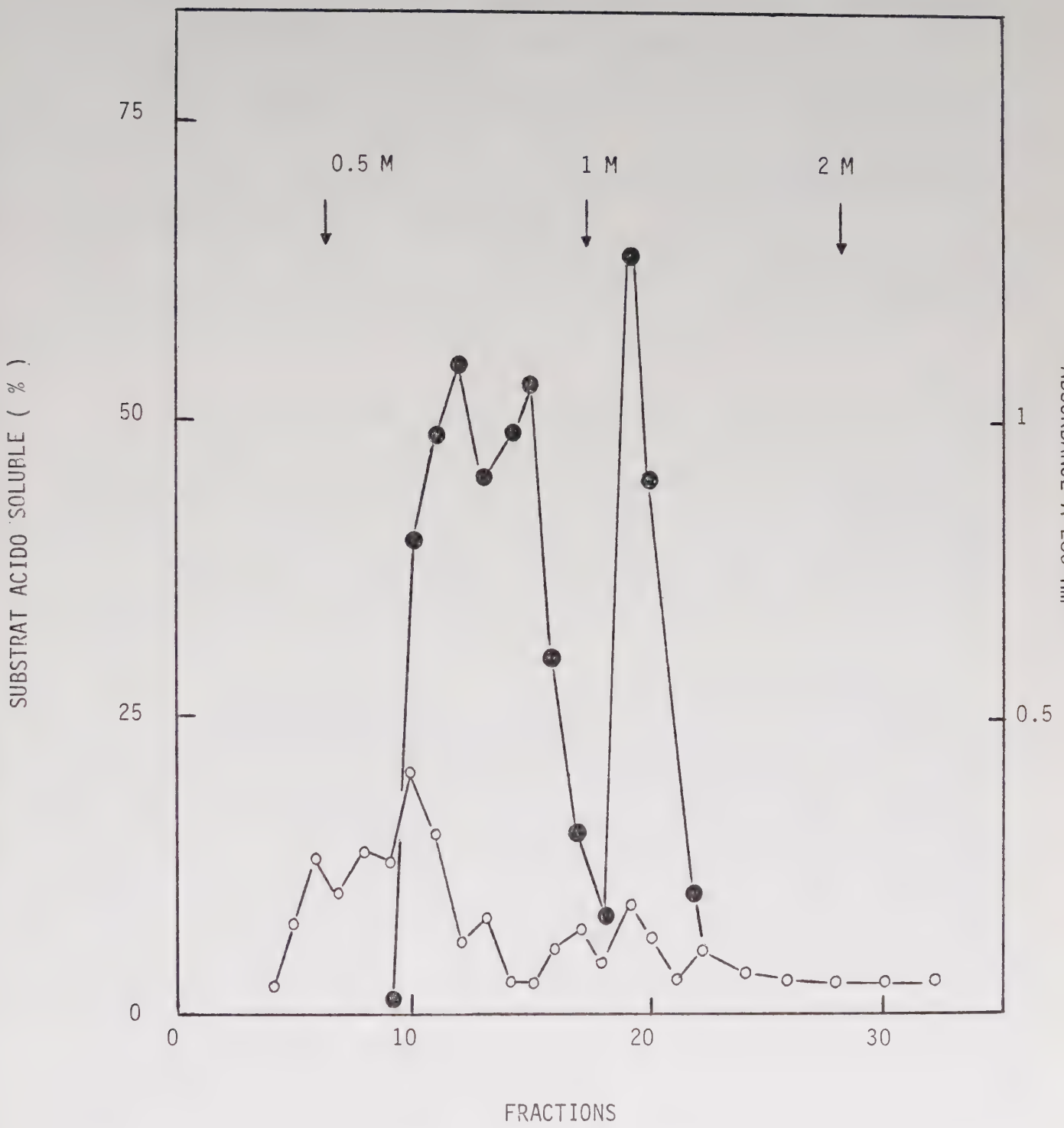
FIGURE 9 : *Purification de la RNAse D - Chromatographie sur poly r(I)-poly r(C) agarose (0.5 x 2 cm).*

Le gel préparé par couplage du poly r(I) ou sépharose 4B et hybridation ultérieure ou poly r(C) (Wagner et al 1971) contient 3.5 mg de polymère par ml. La colonne lavée avec 15 ml de tampon IC est chargée avec une fraction enzymatique prise au stade PCI et rendue 0.5 M en NH_4Cl (3 ml contenant 1.8 mg de protéines). La colonne est ensuite percolée par le tampon IC, le tampon IC 1M NH_4Cl, le tampon IC 2M NH_4Cl.

L'activité RNAse D est mesurée en incubant 2 µl de chaque fraction (0.5 ml) sur le $|^3H|$ poly r(AU) pendant 30 min à 37°.

o——o Densité optique à 280 nm

●——● Activité RNAse D.


75
50
25
0
0.5 M
1 M
2 M
SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
1
0.5
ABSORBANCE A 280 nm
0
10
20
30
FRACTIONS

Séphadex G-75, G-100, le Séphacryl S-200, le Biogel P-150. Ces essais ont été réalisés avec des préparations faites à partir du cytoplasme et après les stades de purification sur DEAE et CM-cellulose. Ce type de chromatographie s'est révélée inexploitable pour un certain nombre de raisons :

- l'enzyme se retrouve dans un grand nombre de fractions parfois d'un bout à l'autre de l'effluent,

- l'activité enzymatique n'est pas toujours retrouvée, peut-être à cause de la dilution qui s'est opérée,

- l'activité prend un caractère labile et nous n'avons jamais réussi à récupérer l'enzyme après concentration. Il est vrai que ceci a été fait par précipitation au sulfate d'ammonium ce qui n'est pas un bon moyen.

Nous n'avons pas vraiment d'explications pour justifier ce morcellement de l'activité tout au long de l'élution. Ce phénomène que l'on retrouve chez les auteurs (ds RNAses de cellule HeLa, Saha et Schlessinger, 1978) est peut-être le résultat de multiples agrégations, notons que la variation de la force ionique que nous avons généralement fixée à 0.15 M n'apporte aucune modification. On peut retrouver dans le chapitre suivant Fig. 18 les résultats obtenus en filtration sur Séphacryl S-200.

Système de partition de phase. Nous avons pensé réaliser sur l'extrait cellulaire brut un système de partition de phase (Albertson, 1960) analogue à celui que propose Babinet (1967) pour purifier la RNA polymérase de E. Coli. Ce procédé permet d'éliminer les acides nucléiques et Hall et Crouch (1977) l'utilisent à cet effet mais, on peut en attendre aussi une purification. L'extrait cellulaire S-30, 0.12 M en KCl est additionné de PEG 6000 et de Dextrane T500 pour avoir 6.7 et 1.6 % final p/v. Après agitation et centrifugation on obtient : la phase supérieure ou "PEG" qui contient des protéines, la phase inférieure ou dextrane qui contient l'ensemble des acides nucléiques plus des protéines qui leur sont resté associées, un culot qui est constitué de protéines dénaturées par ces traitements. La phase PEG est prélevée et le mélange initial est reconstitué en rajoutant à la phase dextrane plus culot, du tampon (Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.12 M, 2-mercaptoéthanol 0.006 M, glycérol 10 %), du PEG 6000, et la quantité de NaCl pour avoir 0.65 M. Après agitation et séparation des phases le même processus est recommencé en présence de 1 M, 2 M et 4 M NaCl. Les activités enzymatiques sont recherchées

dans les phases PEG successives. La phase PEG obtenue à 0.12 M NaCl ne contient pas de RNAse D. Celle-ci par contre est retrouvée dans toutes les autres phases PEG et on garde le sentiment que même à 4 M en NaCl on ne l'a pas entièrement récupérée. Il faut préciser que l'enzyme est partiellement ou totalement contenue dans le culot qui, après les diverses extractions, contient encore 75 % des protéines présentes initialement dans le S-30. Les ssRNAses se répartissent dans toutes les phases PEG obtenues. Ces résultats nous ont apparu peu satisfaisants, ajoutons à cela que la RNAse D se trouve ensuite très mal fixée sur la CM-cellulose, que les hybridases que nous voulions purifier sont totalement inhibées par le Dextrane (Cathala et al., 1979), qu'il est difficile de manipuler des extraits contenant du PEG. L'ensemble de ces arguments nous a fait abandonner cette méthode.

Conclusion. Ce paragraphe en témoigne, la purification des RNAses D de cellules eucaryotes n'est pas une entreprise facile et on reste dans l'embarras quand il s'agit d'améliorer les résultats obtenus. Cependant, il est possible que l'on puisse encore tirer partie de la phosphocellulose qui à notre sens constitue le support idéal dans ce cas précis.

C H A P I T R E II

P R O P R I E T E S D E L A R N A S E D

A - *PROPRIETES ENZYMATIQUES*

a) Hydrolyse du RNA double chaîne - Spécificité de substrat

Nous définissons l'activité dsRNAse comme la capacité de rendre acido-soluble un RNA de structure bicaténaire. Cela revient donc à définir la structure bicaténaire en termes opérationnels.

L'appariement de type Watson-Crick est bien sur indispensable mais non suffisant pour garantir cet état. En effet la structure bicaténaire n'est pas figée, elle peut évoluer dans le temps et dans l'espace et fondre partiellement à l'état de segments simple chaîne. Nous avons adopté un critère fonctionnel : un substrat est double chaîne dans les conditions expérimentales choisies , s'il reste acido-précipitable à 80-90 % en présence de 1 µg/ml de RNAse A pendant 2 h à 37° ou de 12.5 µg/ml de RNAse A pendant 30 min à 25°. Inversement un substrat est simple chaîne s'il devient acido-soluble à 80-90 % par ces mêmes traitements. Cette condition étant remplie nous admettons que la dégradation d'un dsRNA ne peut provenir que de l'action d'une dsRNAse (en l'absence d'exonucléase). On sait que la résistance de la double chaîne est essentiellement fonction de l'environnement ionique, c'est pourquoi il est impératif, à notre sens, d'effectuer les mesures d'activité à une force ionique au moins égale à 0.1 puisque, jusqu'en fin de préparation nous avons aussi des RNAses dont l'action est semblable à celle de la RNAse A. A ce sujet nous nous étonnons que certains auteurs puissent effectuer leur mesure d'activité en présence de très faibles concentrations en cations monovalents

(Ohtsuki, 1977) (Saha et Schlessinger, 1978).

Nous avons généralement constaté que la vitesse de dégradation du substrat décroît constamment jusqu'à s'annuler au bout de 30 à 45 min. Ceci se traduit alors par un plateau (Fig. 10 A) situé bien souvent aux environs de 50 % de dégradation.

L'allure non linéaire de la première partie de la courbe s'explique probablement par le fait que l'on travaille à faible concentration en substrat. Ceci est obligatoire si l'on veut que l'activité mesurée ne soit pas de l'ordre du bruit de fond.

De surcroît le mode de coupure de l'enzyme -que nous ne connaissons pas en fait- peut rendre non linéaire la relation entre le caractère acido-soluble et l'activité enzymatique. Tous ces phénomènes rendent donc très difficile et peut-être illusoire l'appréciation de la vitesse initiale de dégradation du substrat. Néanmoins, avec l'enzyme purifiée, il est possible d'avoir proportionalité approximative entre la quantité d'enzyme présente et la quantité de substrat dégradé par unité de temps (Fig. 10 B).

L'existence d'un plateau est difficile à expliquer. On peut avancer au moins deux hypothèses : l'enzyme s'inactive en cours d'incubation ou le substrat partiellement dégradé n'est plus reconnu par l'enzyme, n'est plus "substrat". Il est à noter que ce plateau est d'autant plus haut et s'installe d'autant plus vite que la préparation enzymatique est plus âgée.

Au cours de ce travail nous avons constamment mesuré le substrat qui reste acido-précipitable. Ceci est critiquable dans la mesure où on ne s'assure pas que la radioactivité perdue dans la fraction précipitable retenue sur filtre est devenue acido-soluble et peut être comptée dans le surnageant. Cette vérification a été réalisée sur le $|^{32}P|$ poly r(AU) et le $|^{32}P|$ RNA de phage Φ6. (Fig. 11).

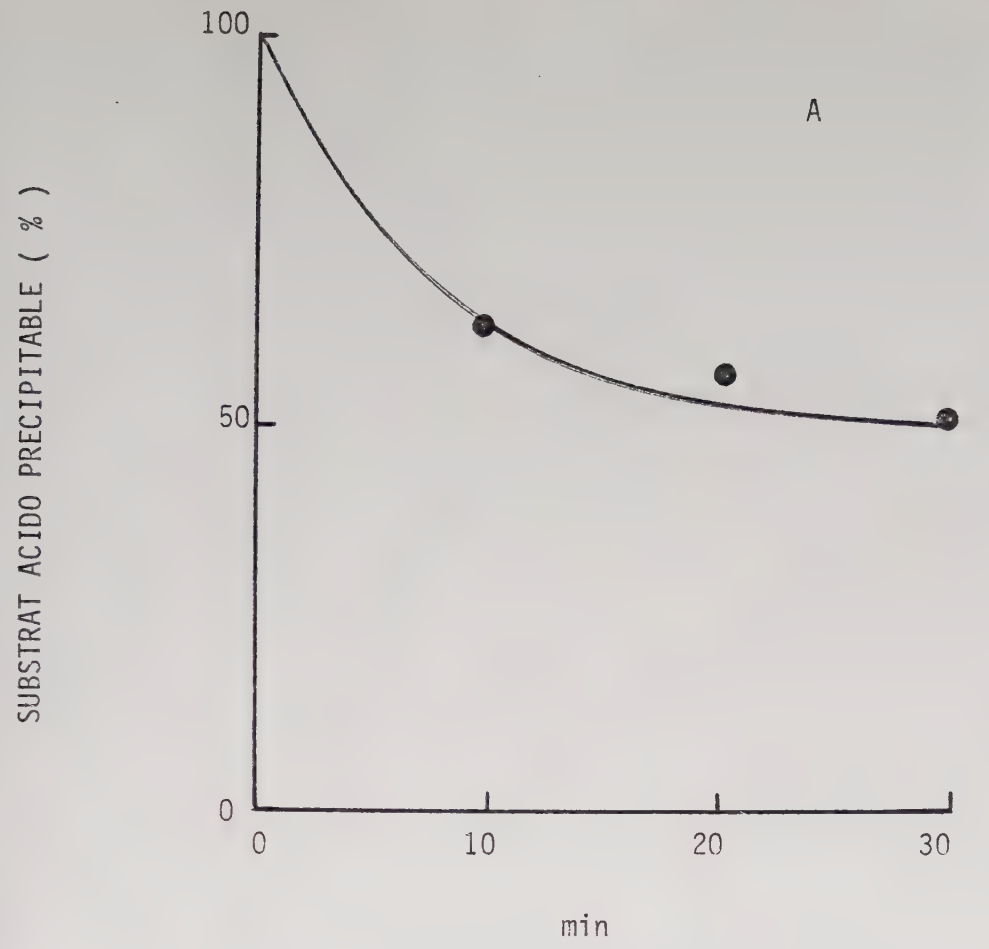
Le bromure d'éthidium s'intercale dans le RNA double chaîne (Le Pecq et Paoletti, 1967) et il a été montré que l'action de la RNAse III de E. Coli était de ce fait bloquée (Gotoh et al., 1974). A 10^{-5}M en BET nous avons toujours observé une inhibition totale de la RNAse D (Fig. 12).

Tous les RNA double chaîne que nous avons pu préparer ou obtenir, synthétiques ou naturels ont été soumis à l'enzyme que nous avons purifiée.

FIGURE 10 : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D.*

A - Cinétique en fonction du temps. Chaque essai contient 1.5 µg de protéines totales (substrat $|^3H|$ poly r(AU)).

B - Effet de la concentration en enzyme. La quantité varie de 0 à 2.5 µg de protéines par essai. Chaque point représente la quantité de substrat resté acido précipitable au bout de 15 min et calculé à partir d'une cinétique réalisée avec deux temps d'incubation 15 et 30 min.


100
50
0
A
SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
0
10
20
30
min

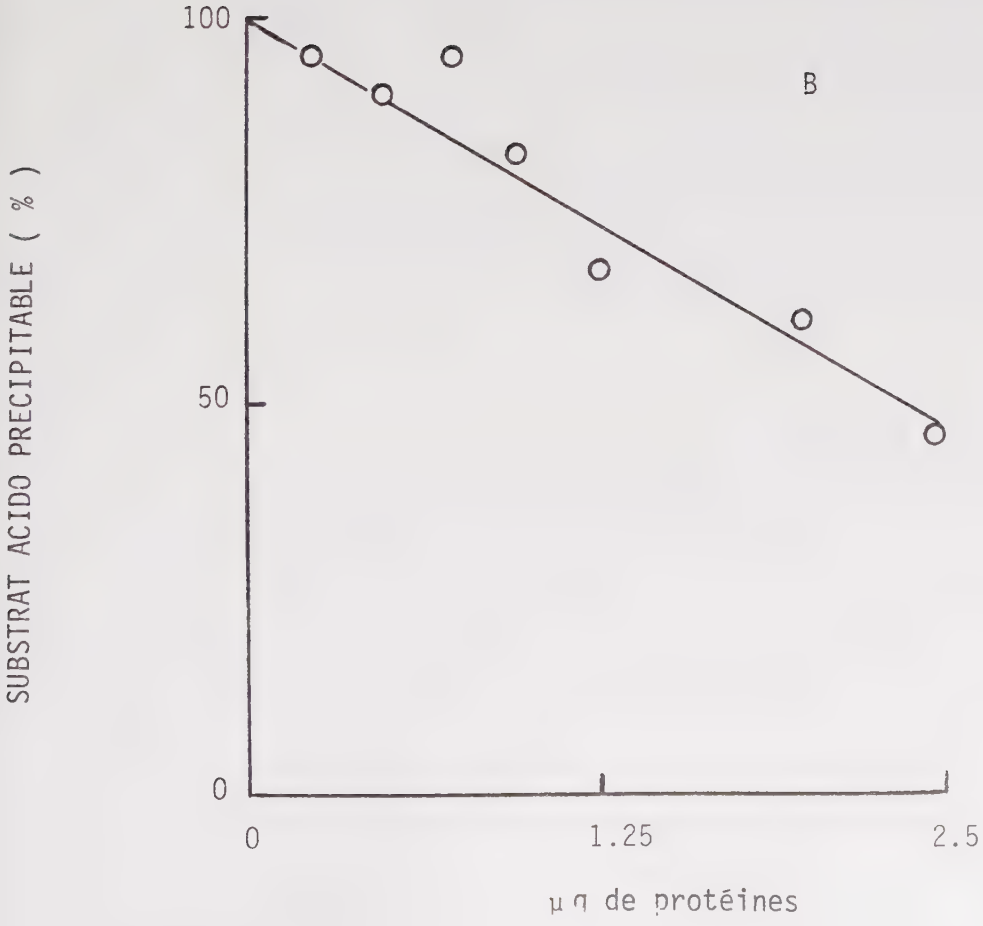

100
50
0
B
SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
0
1.25
2.5
µg de protéines

FIGURE 11 : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Mesure du substrat acido-soluble.

0.5 nmole de $[^{32}P]$ poly r(AU) sont incubées avec 3 µg de protéines dans un tube de comptage à scintillation. Après les temps indiqués, le milieu est rendu 5 % en TCA en présence de 100 µg/ml de sérum-albumine. Après un repos de 10 min dans la glace, les tubes sont centrifugés et le surnageant est transféré dans un autre tube. Le culot est remis en suspension dans 1 ml de TCA 5 % et après centrifugation le 2ème surnageant est réuni au premier. Les surnageants et les précipités sont comptés par effet Cerenkov.

●——● acido soluble mesuré

×——× acido soluble calculé d'après la quantité de substrat resté précipitable

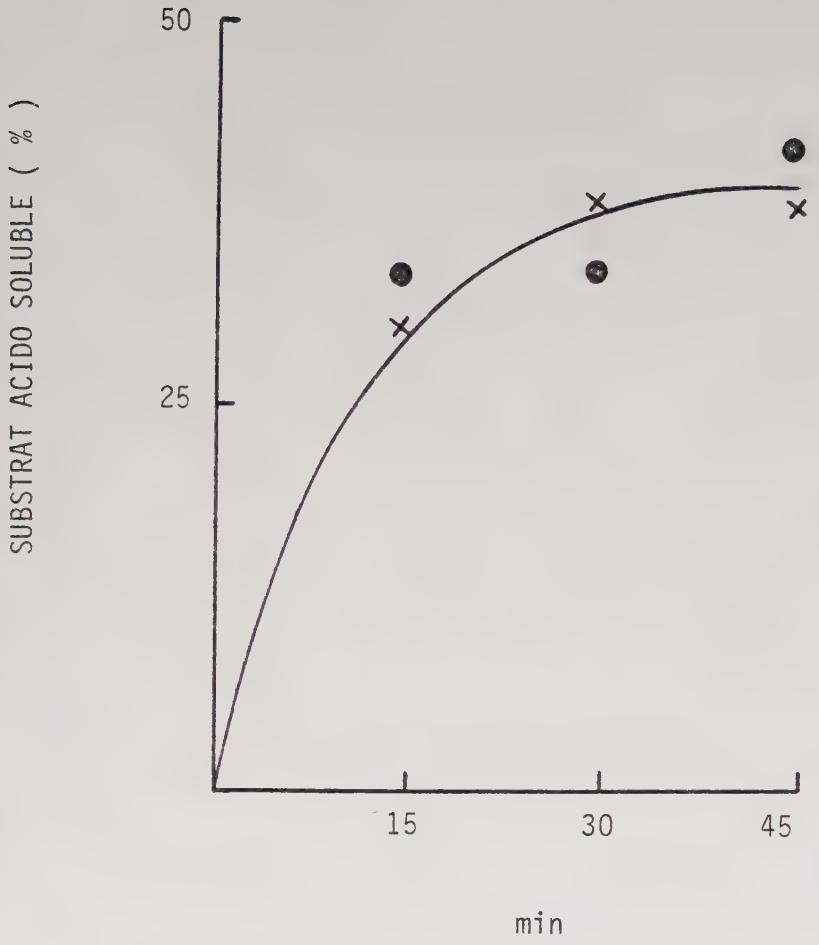
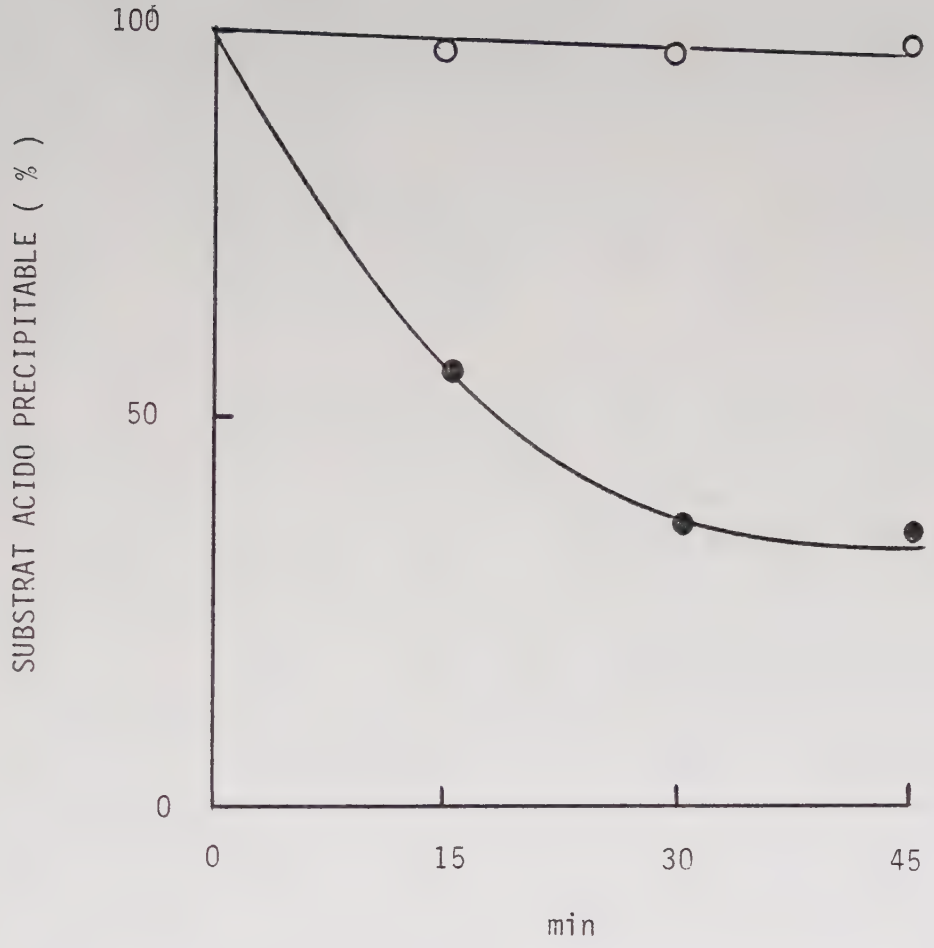

SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
50
25
15
30
45
min

FIGURE 12 : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Effet du bromure d'éthidium.

Les essais sont réalisés comme il est décrit dans les méthodes en utilisant le $|^3H|$ poly r(AU) comme substrat.

●——● en absence de BET

○——○ avec 10^{-5}M BET


SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
100
50
0
0
15
30
45
min

Tous, sans aucune ambiguïté, ont été hydrolysés (Fig. 13). En voici la liste :

|^{3}H| poly r(AU)

|^{14}C| poly r(C) - poly r(G)

|^{3}H| poly r(G) - poly r(C)

|^{32}P| RNA MS_2 forme réplicative

|^{32}P| RNA $\phi 6$

|^{32}P| RNA $Q\beta$ forme réplicative

|^{32}P| dsRNA nucléaire

Ces substrats ont été utilisés avec des préparations d'enzyme différentes, on ne peut donc comparer leur hydrolyse respective, d'autant, que les inégalités des activités spécifiques nous ont obligés à modifier parfois la concentration en substrat. Il est intéressant de noter que le poly r(G) - poly r(C) est dégradé quel que soit le brin radioactif.

La RNAse D que nous avons purifiée n'hydrolyse-t-elle que le dsRNA ? Nous avons déjà dit qu'en fin de purification dans les mêmes conditions expérimentales (concentration en substrat, temps d'incubation, t°) nous observions des activités égales sur le |^{3}H| poly r(AU) et le |^{3}H| poly r(C). Ces deux activités sont-elles portées par la même molécule ? La RNAse III de E. Coli paraît introduire des coupures dans le ssRNA (Dunn, 1976) (Dunn et al., 1976). Dans les travaux consacrés aux RNAses D, les auteurs précisent que l'activité exercée sur le ssRNA par la RNAse D purifiée n'est jamais nulle, ils admettent généralement que c'est le fait de RNAses contaminantes. Nous sommes de cet avis car nous avons pu à la faveur de colonnes de chromatographies constater la non coïncidence des deux activités.

Nous avons essayé de |^{32}P| RNA de phage $\phi 6$ natif et dénaturé avec chacune des fractions enzymatiques du stade PC_3. Nous avons obtenu avec certaines fractions le résultat présenté Fig. 14, c'est-à-dire une dégradation nettement plus importante sur le dsRNA que sur le ssRNA. Nous pensons que ce résultat démontre que l'enzyme purifiée est spécifique du dsRNA et mérite le nom de RNAse D.

FIGURE 13 : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Hydrolyse de différents substrats.

Les incubations sont réalisées pendant les temps indiqués avec :

0.12 nmole de forme réplicative de Qβ

0.12 nmole de $|^{14}C|$ poly r(C)-poly r(G)

0.14 nmole de forme réplicative de MS_2

0.6 nmole de RNA de ϕ 6

1500 cpm de ds HnRNA

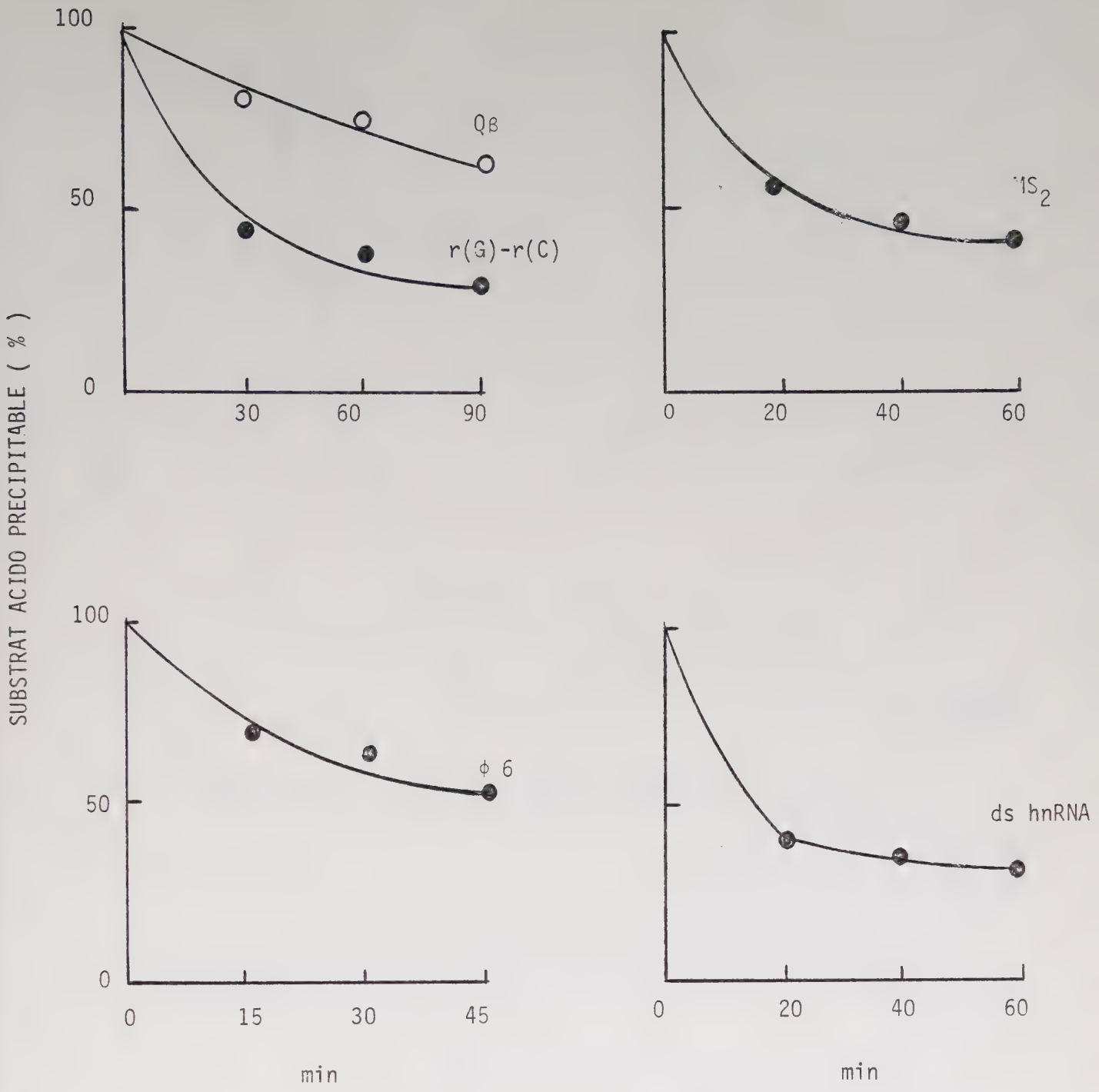

SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
100
50
0
Qβ
r(G)-r(C)
30
60
90
MS2
0
20
40
60
100
50
0
φ 6
0
15
30
45
min
ds hnRNA
0
20
40
60
min

FIGURE 14 :

1 - 0.6 nmole de $|^{32}P|$dsRNA de phage ϕ 6 sont incubées pendant les temps indiqués à 37° avec :

O——O - 0.1 µg de RNAse A

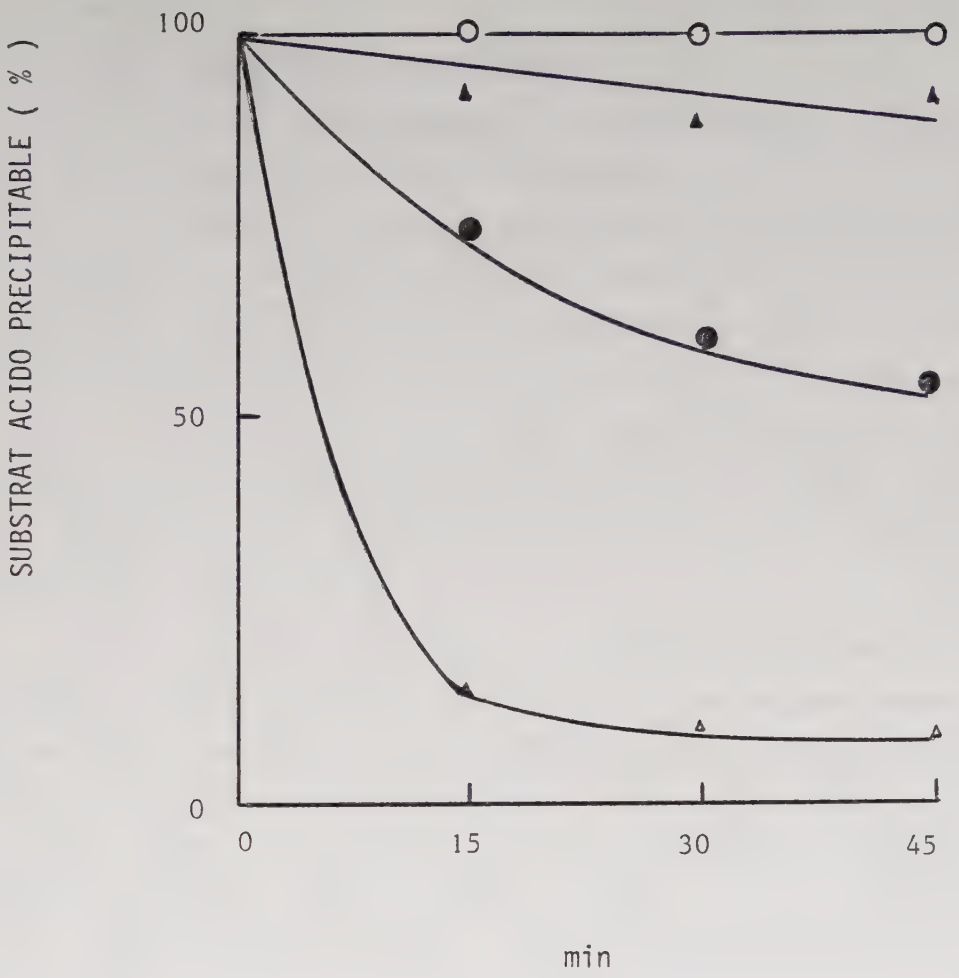
●——● - 2.5 µg de RNAse D

2 - Le $|^{32}P|$ RNA de phage ϕ 6 est dénaturé par chauffage (90 sec à 100°) dans une solution d'EDTA 0.01 M, puis refroidi brusquement à 0°.

0.6 nmole de $|^{32}P|$ ssRNA sont incubées à 37° avec

△——△ - 0.1 µg de RNAse A

▲——▲ - 2.5 µg de RNAse D


SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
100
50
0
0
15
30
45
min

b) Sensibilité au magnésium

Avant chromatographie sur DEAE-cellulose la préparation enzymatique est sans ambiguïté possible dépendante de Mg^{++}. Le seul fait de retirer l'acétate de magnésium du milieu donne une activité nulle sans autre traitement (Fig. 15). L'activité est restaurée par addition de Mg^{++} et devient optimale à partir de 10^{-3}M. Le même résultat peut être obtenu avec le manganèse, par contre le calcium est incapable de rétablir l'activité.

Après passage sur DEAE-cellulose la préparation enzymatique ne montre plus la même exigence vis-à-vis de Mg^{++}. En absence de Mg^{++} l'activité n'est pas nulle et il faut rajouter de l'EDTA dans l'essai pour observer une diminution d'activité (Fig. 16).

Comment expliquer cette différence de sensibilité au Mg^{++} en cours de purification ? Au stade PC_I nous avons en même temps que la RNAse D une activité exonucléase dont l'existence est prouvée sans équivoque au chapitre suivant. Nous pensons que cette enzyme correspond à celle décrite par Lazarus et Sporn (1967) dans les ascites d'Ehrlich : cette dernière dégrade essentiellement les substrats simple chaîne jusqu'au stade mononucléotide 5'P en exigeant du Mg^{++} ou Mn^{++} à une concentration de 10^{-3}M (le Ca^{++} est inefficace) ; elle est retenue sur DEAE-cellulose. Il est possible que les fragments issus des premières coupures de la RNAse D ne soient pas acido-solubles mais qu'ils le deviennent immédiatement par action de l'exonucléase. Il peut se faire alors que nous soyons dans des conditions où le caractère d'acido solubilité soit uniquement dépendant de cette exonucléase donc du Mg^{++} (au moins dans un premier temps). Ce phénomène ne pourrait plus intervenir après DEAE-cellulose puisque cette résine permet d'éliminer cette exonucléase.

Il semble donc que la RNAse D soit indépendante du Mg^{++} présent dans l'essai enzymatique ; peut-on conclure qu'il n'en n'est pas pour autant nécessaire ? Outre que l'addition d'EDTA inhibe tout de même l'activité RNAse D, il est toujours possible que le Mg^{++} soit apporté à une concentration infinitésimale par le substrat lui-même. En effet celui-ci est obligatoirement synthétisé en présence de Mg^{++} et on sait que ce cation est fortement attaché à la structure nucléique. Précisons tout de même que le traitement du substrat par dialyse contre des solutions d'EDTA ne modifie pas sensiblement les résultats. Enfin l'hypothèse d'un atome de Mg^{++} intimement lié à la structure protéique de l'enzyme reste à démontrer.

FIGURE 15 A : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Sensibilité au Magnésium.

1 - 0.6 µg de protéines au stade PC_1 sont incubées avec 0.1 nmole de $|^3H|$poly r(AU) pendant les temps indiqués

▲——▲ en présence de 0.01 M Mg^{++}

△——△ en absence de Mg^{++}

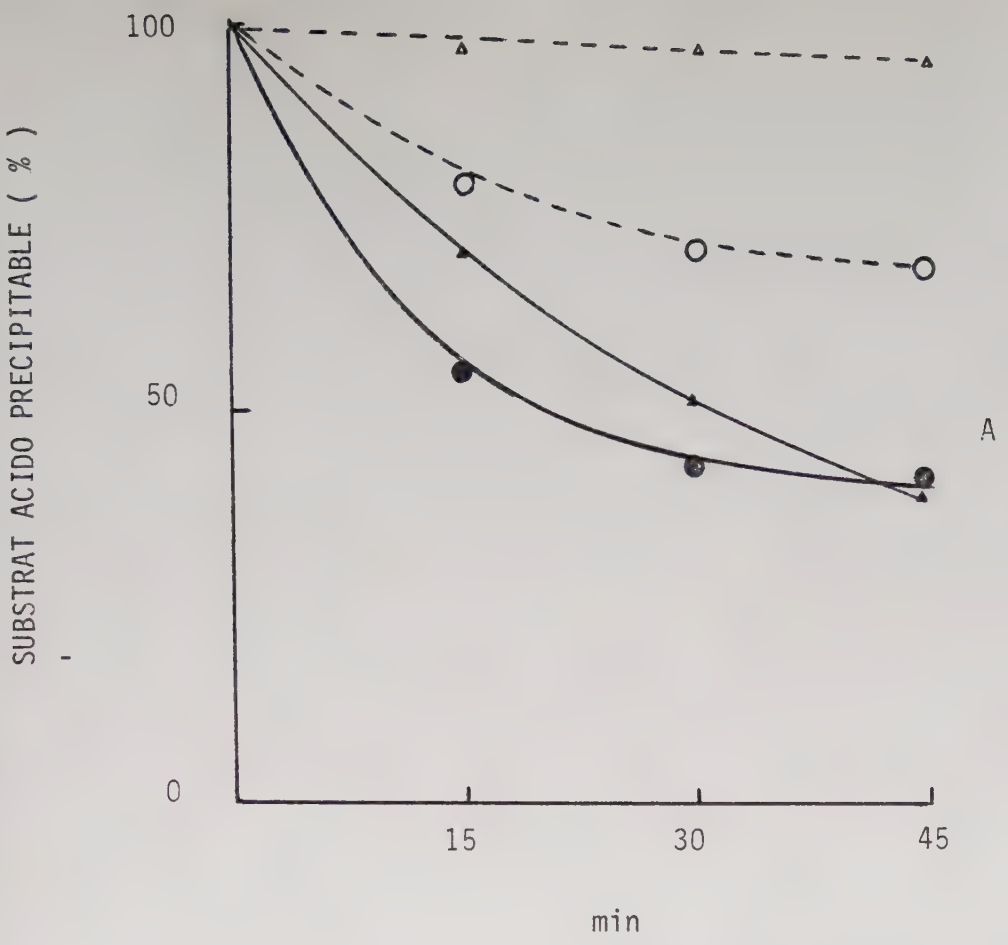
2 - 3 µg de protéines au stade PC_1 sont incubées comme ci-dessus

●——● en présence de 0.01 M Mg^{++}

○——○ en absence de Mg^{++}

FIGURE 15 B : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Restauration de l'activité par le magnésium.

0.6 µg de protéines au stade PC_1 sont incubés avec 0.1 nmole de $|^3H|$poly r(AU) en présence des concentrations indiquées de Mg^{++}. Chaque point représente l'activité calculée d'après une cinétique (15 et 30 min d'incubation) et exprimée en % de l'activité obtenue en présence de 0.01 M Mg^{++}.


SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
100
50
0
15
30
45
min
A

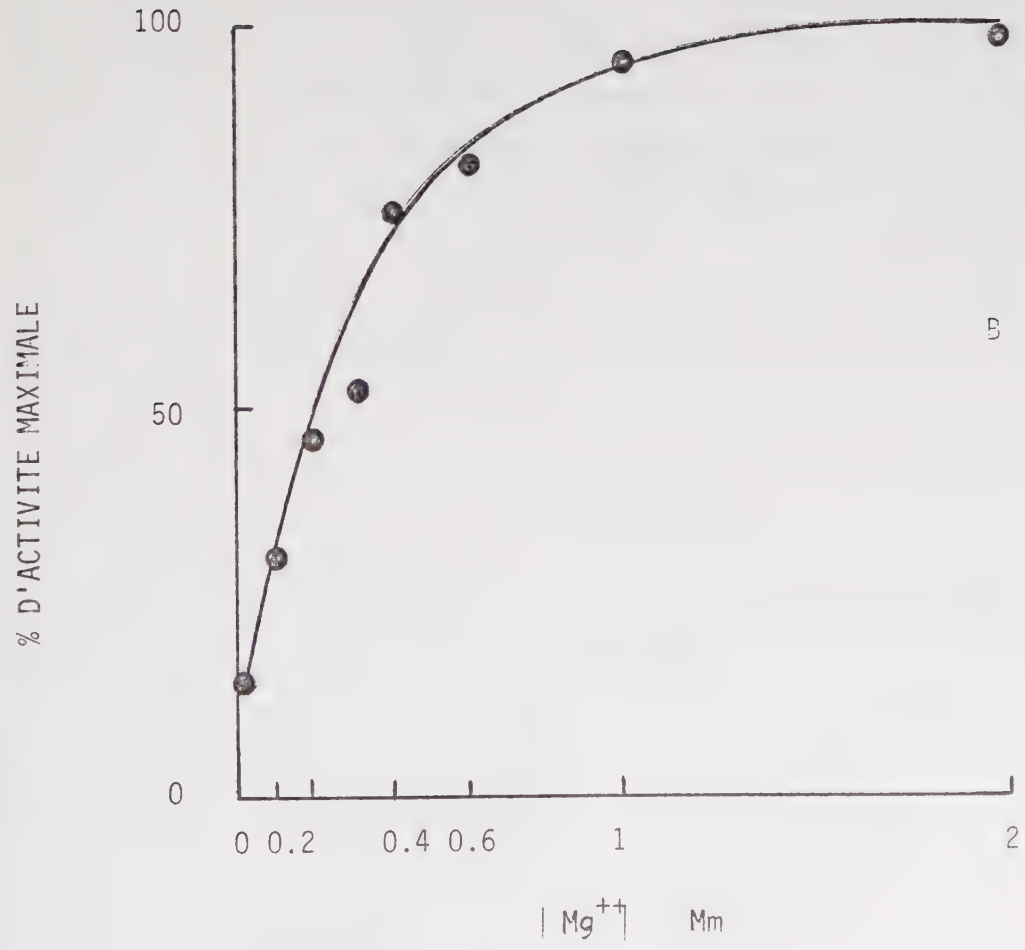
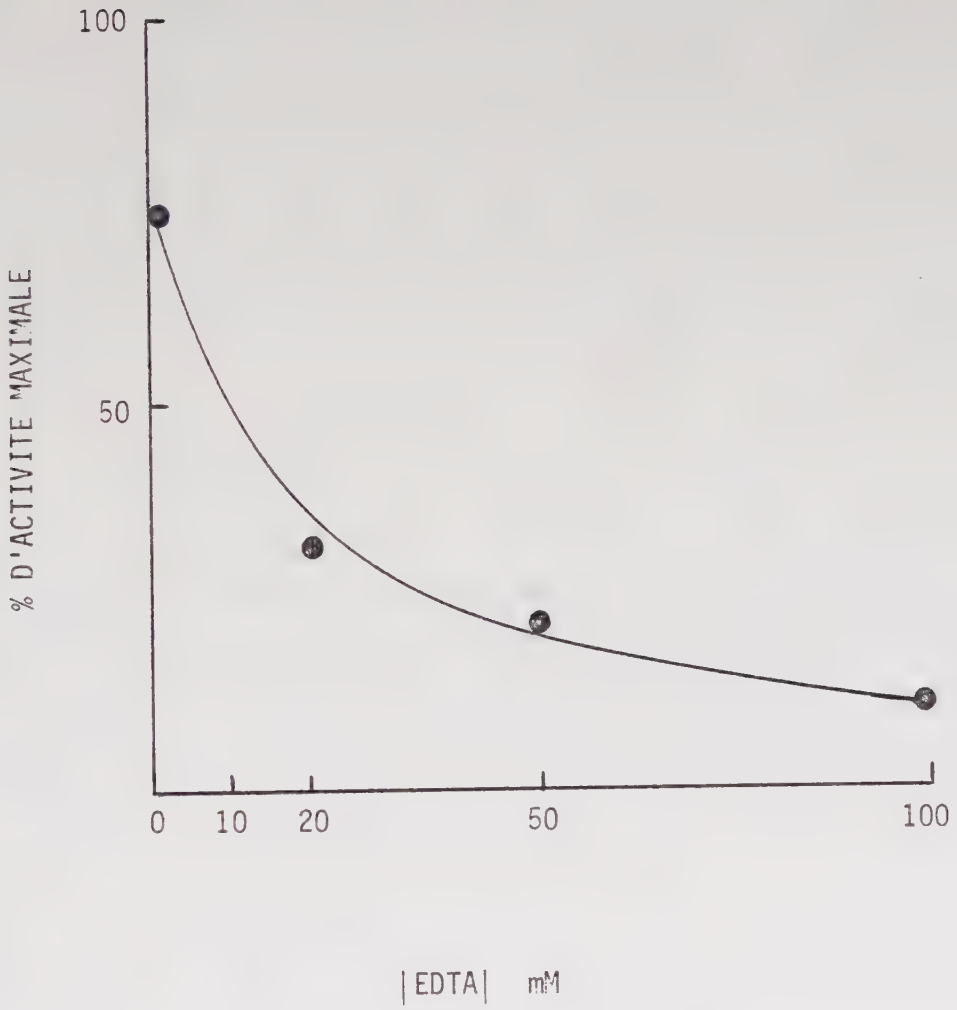

% D'ACTIVITE MAXIMALE
100
50
0
0 0.2
0.4 0.6
1
2
| Mg++ | Mm
B

FIGURE 16 : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Effet de l'EDTA.

0.4 µg de protéines au stade final de purification sont incubées avec 0.12 nmole de $|^{32}P|$ RNA de phage Qβ en présence des concentrations indiquées l'EDTA. Chaque point représente l'activité déduite d'une cinétique (30 et 60 min d'incubation) et exprimée en % de l'activité obtenue en présence de 0.01 M magnésium. Le point O EDTA est le résultat d'une incubation sans Mg et sans EDTA.


100
50
% D'ACTIVITE MAXIMALE
0
10
20
50
100
|EDTA| mM

En résumé nous pensons qu'au stade PC_1 nos préparations contiennent à la fois de la RNAse D qui est peu ou pas sensible au Mg^{++} exogène, et une exonucléase qui, elle, est étroitement dépendante de Mg^{++} ; les deux activités complémentaires étant dosées simultanément par notre test. Si on n'observe pas d'activité au stade PC_I en absence de Mg^{++}, cela signifierait que l'activité exonucléase est tout simplement beaucoup plus importante que celle de la RNAse D : et de fait, il suffit de multiplier par 5 la quantité de solution enzymatique présente dans l'essai sans Mg^{++} pour observer une activité.

c) Effets des cations monovalents K^+, NH_4^+, Na^+

Pour des raisons déjà précisées il est impossible de réaliser des cinétiques à une concentration inférieure à 0.1 M. Au-dessus de 0.15 M et pour chacun des trois cations, on constate une inhibition de l'activité qui devient totale après 0.25 M. Dans l'intervalle de concentration 0.1 M - 0.15 M, K^+ et NH_4^+ se comportent de façon équivalente. Par contre Na^+ donne des résultats irréguliers et peu reproductibles, il n'a jamais été utilisé.

d) Compétition

Un autre argument en faveur de l'activité dsRNAse serait de montrer qu'un RNA bicaténaire non marqué, rajouté au substrat radioactif, inhibe la dégradation de celui-ci. Ces expériences de compétition ont été réalisées avec la forme réplicative de MS_2 sur le $|^{14}C|$ poly r(C) - poly r(G) et avec le RNA de $\phi 6$ sur le $|^{3}H|$ poly r(AU) (Fig. 17). Les résultats sont toujours comparables ; nous observons une compétition qui devient totale lorsqu'il y a 50 à 100 fois plus de substrat non marqué que de substrat marqué.

Cependant nous avons trouvé un résultat identique en utilisant comme compétiteur : le RNA ribosomal de E. Coli, le poly r(C), le poly r(U), le poly r(A), le DNA natif de thymus de veau, le DNA dénaturé de cellules HeLa et l'héparine. S'il reste possible de justifier la compétition d'un RNA monocaténaire par une potentielle structure secondaire, on voit mal comment justifier la compétition par le DNA et l'héparine autrement que par un effet de charges. Les inhibitions observées nous semblent donc imputables à la nature polyanionique plutôt qu'à la structure des polymères utilisés.

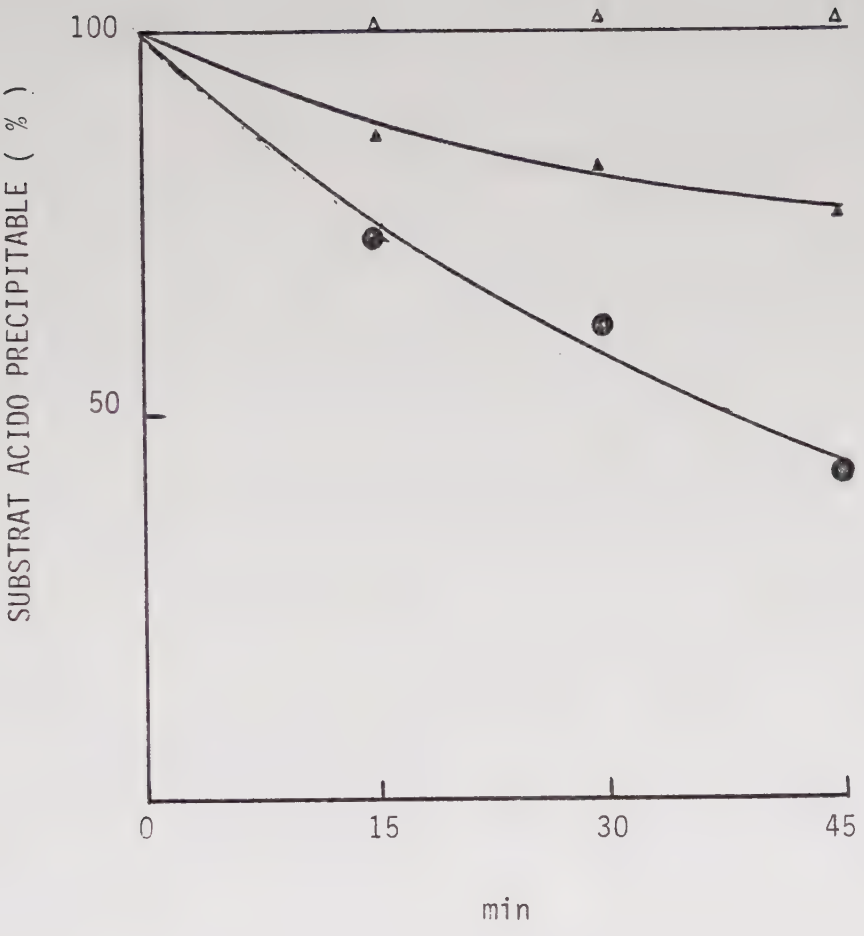
FIGURE 17 : *Etude des propriétés enzymatiques de la RNAse D*
Compétition par le dsRNA.

0.5 µg de protéines au stade ultime de purification sont incubées dans les conditions standards pendant les temps indiqués avec 0.05 nmole de $|^{3}H|$poly r(AU) et :

●——● sans addition

▲——▲ 0.5 nmole de RNA

△——△ 25 nmoles " "


100
50
SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE (%)
0
15
30
45
min

Bien sûr ces expériences sont réalisées in vitro, avec une enzyme purifiée et retirée donc de son environnement naturel, mais il n'est pas sans intérêt au moins dans un but opérationnel, de noter que le RNA simple chaîne peut être inhibiteur des coupures au niveau du double chaîne.

e) Conclusion

Comme on peut le remarquer, nous n'avons pas fait une étude exhaustive des propriétés cinétiques de cette enzyme. Il y a deux raisons essentielles à cela :

Les difficultés rencontrées pour mesurer spécifiquement cette activité font que nous ne pouvons en donner qu'une description grossière. De surcroît, l'enjeu est peut-être ailleurs et nous pouvons nous demander si nous utilisons cette enzyme correctement : nous lui faisons dégrader un substrat bicaténaire jusqu'au stade acido soluble alors que, son rôle in vivo consiste peut-être en coupures discrètes sur un substrat dont la structure n'est qu'apparentée à ceux que nous utilisons.

Nous nous sommes donc limités aux paramètres qui peuvent définir les meilleurs conditions d'utilisation de cette enzyme.

B - PROPRIETES MOLECULAIRES

La seule que nous avons envisagée est l'estimation de la masse moléculaire de l'enzyme.

Une électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS ne peut nous apporter ce renseignement puisque nous n'avons pas atteint le stade homogène.

La technique de renaturation in situ après électrophorèse en gel SDS ne donne pas vraiment de résultat et nous suggère seulement que trois polypeptides compris entre 24 et 28 000 ont fixé le $|^{32}P|$ poly r (AU).

Plusieurs filtrations sur Séphadex G-75, G-100, G-200 et Séphacryl S 200 ont été réalisées. Nous avons dit dans le chapitre précédent les difficultés rencontrées avec ce type de colonne à savoir un émiettement de l'enzyme tout au long de l'effluent.

En Séphadex G-200 comme il est dit dans l'article 1 annexé à ce texte, nous trouvons la majorité de l'activité distribuée au niveau du marqueur γ-globuline. Cependant ce pic comporte toujours un épaulement dont le volume d'élution se situe à la masse de 50 000 d'après la droite d'étalonnage.

En Séphacryl S-200 la RNAse D est beaucoup mieux focalisée mais les résultats diffèrent d'une chromatographie à l'autre. Lors d'une première filtration la RNAse D a été uniquement retrouvée après l'ovalbumine et la position du pic correspond à la masse de 20 à 25 000 (Fig. 18, enzyme 1). Notons que cette enzyme s'est désactivée en quelques heures. Lors d'une 2ème expérience la totalité de la RNAse D s'est située entre les deux marqueurs ovalbumine et sérum albumine (Fig. 18, enzyme 2) ce qui équivaut à 55 - 60 000 de masse moléculaire.

L'ultracentrifugation en gradient de glycérol a été assez peu utilisée car nous rencontrons à peu près les mêmes difficultés qu'en gel filtration. La Fig. 19 donne le tracé d'un profil obtenu avec la RNAse D et quelques molécules de taille connue après centrifugation en gradient de glycérol. Comme on peut le constater l'activité se localise essentiellement au niveau de l'ovalbumine.

Peut-on conclure ? Nous pensons que les localisations de la RNAse D dans la zone 20 - 25 000 et 50 - 60 000, directes ou indirectes, coïncident trop pourqu'elles soient uniquement le fruit du hasard. Il nous paraît donc que l'enzyme est constituée de 1 ou plusieurs sous-unités identiques ou différentes. Nous pensons que pour des raisons inconnues l'enzyme a été dissociée au cours de son passage sur Séphacryl mais est restée active quelques heures. Apparemment ce fait n'est pas unique car Robertson (1977) signale qu'il a obtenu la RNAse III de E. Coli à la position 50 000 et 25 000 après filtration sur G-100 (il est admis que cette enzyme est constituée de deux sous-unités de 25 000 daltons).

FIGURE 18 : *Estimation de la masse moléculaire de la RNAse D*
Filtration sur Séphacryl S-200.

3 à 4 mg de protéines en solution dans 2 ml de tampon (Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.15 M, 2-mercaptoéthanol 0.006 M, glycérol 10 %) sont déposés sur une colonne de Séphacryl S-200 (1.5 x 90 cm) équilibré dans ce tampon. La colonne est développée à 12 ml/heure et les fractions collectées ont un volume de 2 ml. L'activité RNAse D est mesurée avec 40 µl d'effluent sur le $|^3H|$ poly r(AU). Les molécules de référence Blue dextran, γ-globuline (150000) sérum albumine (67000), ovalbumine (45000) sont chromatographiées séparément et dans les mêmes conditions. Nous avons utilisé le paramètre de Laurent et Killander (1964)

$$K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

pour construire la droite d'étalonnage $K_{av} = f(\log PM)$.

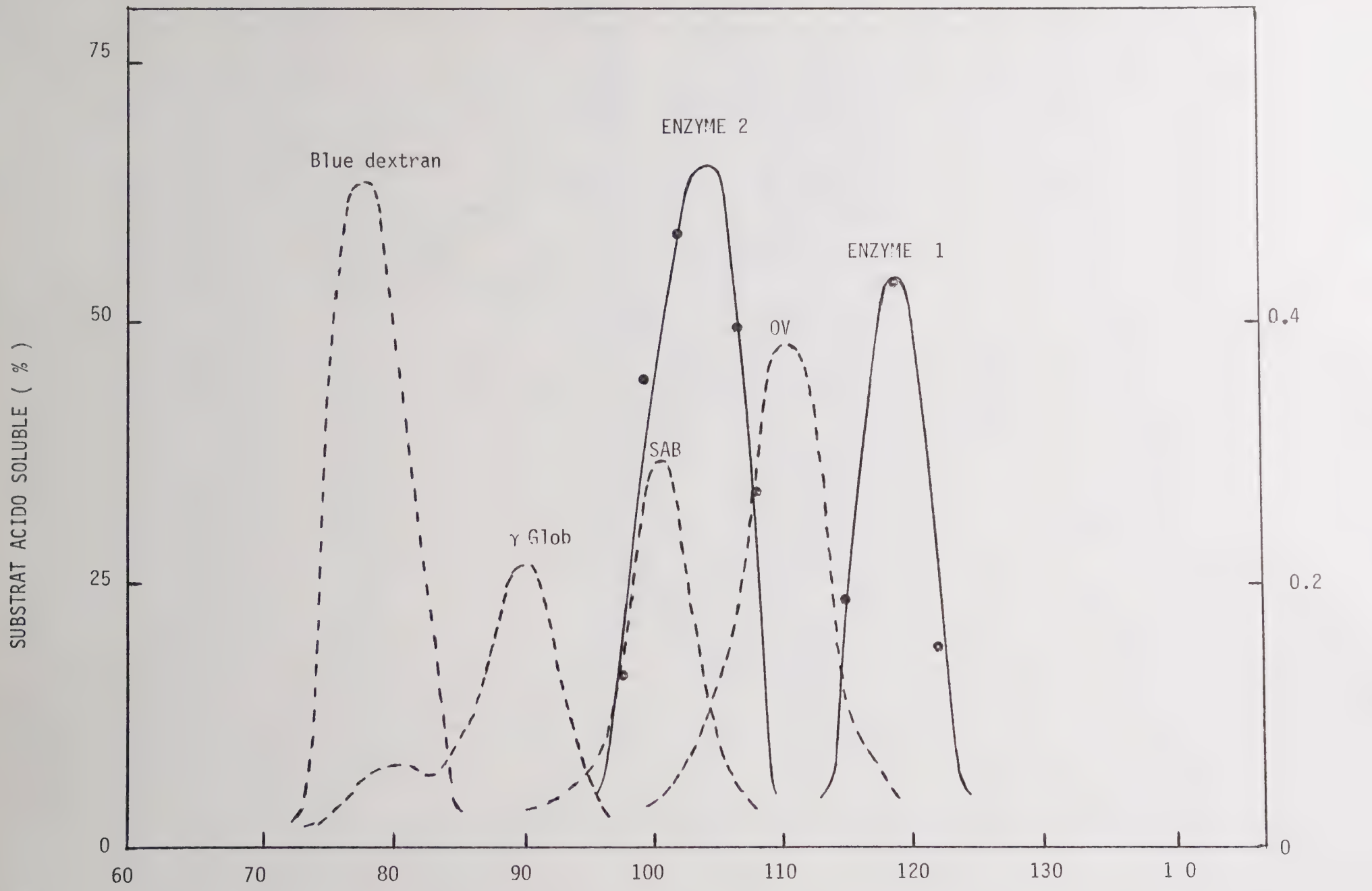
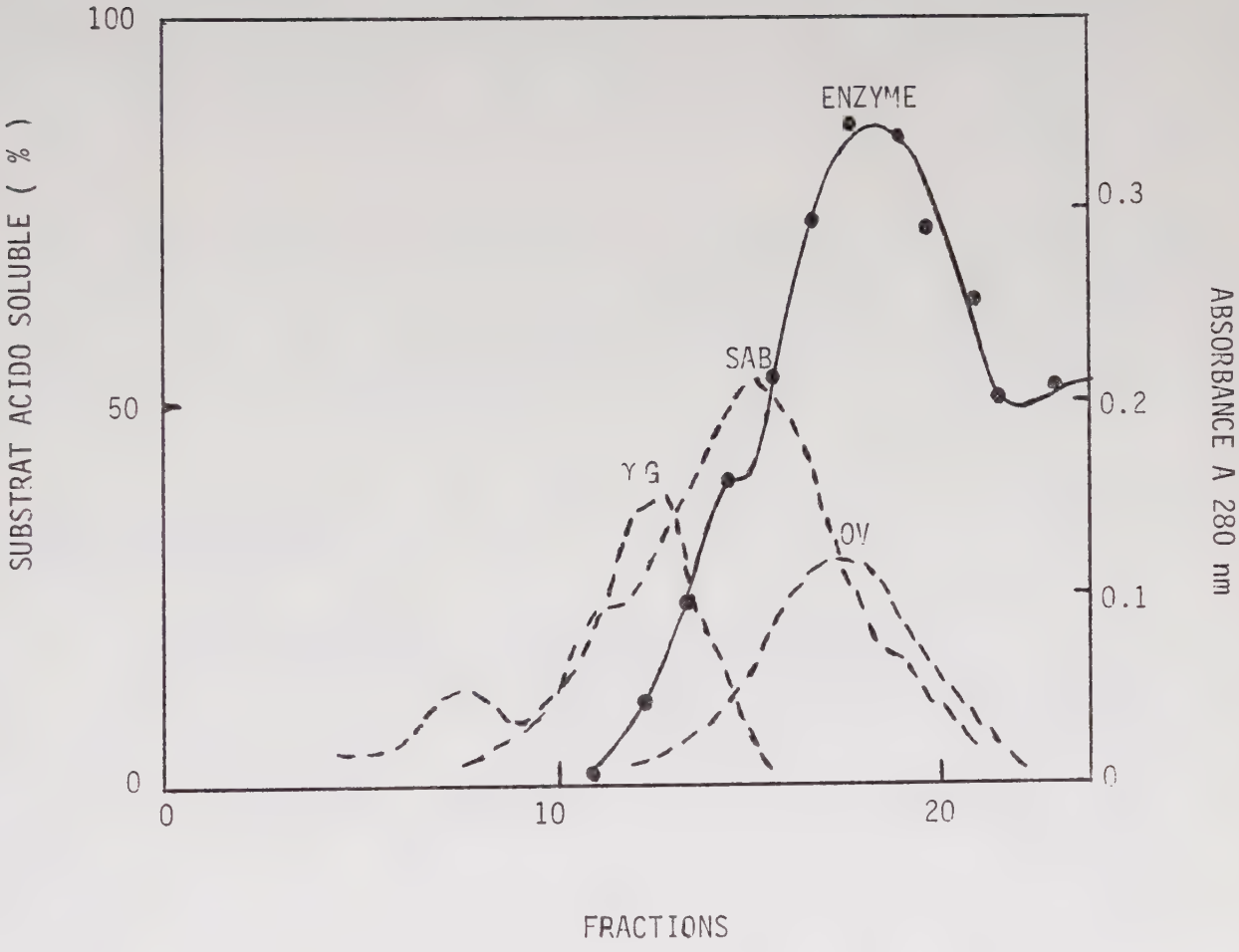

Blue dextran
ENZYME 2
ENZYME 1
OV
SAB
γ Glob
SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
ABSORBANCE A 280 nm
75
50
25
0
0.4
0.2
0
60
70
80
90
100
110
120
130
1 0

FIGURE 19 : *Estimation de la masse moléculaire de la RNAse D. Ultracentrifugation en gradient de glycérol.*

2 à 3 mg de protéines en solution dans 0.5 ml de tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.125 M, AcMg 0.01 M, 2-mercaptoéthanol 0.006 M sont déposés sur un gradient 10-30 % de glycérol p/v dans ce tampon. La centrifugation est faite dans le rotor SW 41 pendant 21 h à 39000 RPM. Après fractionnement la RNAse D est mesurée sur des aliquotes de 30 µl en utilisant le $|^{14}C|$ poly r(C)-poly r(G).


100
50
0
0
10
20
ENZYME
SAB
γG
OV
0.3
0.2
0.1
0
SUBSTRAT ACIDO SOLUBLE (%)
ABSORBANCE A 280 nm
FRACTIONS

C H A P I T R E III

E T U D E D E S P R O D U I T S D E D I G E S T I O N

Dans ce chapitre nous essayons de caractériser les fragments coupés par le RNAse D à partir de substrats bicaténaires qui sont : le poly r(AU), le poly r(G) - poly r(C), le RNA de phage ϕ6. Deux aspects sont envisagés : la taille et la nature des extrémités.

A - TAILLE DES FRAGMENTS

a) Avant le stade de purification sur DEAE-cellulose

Chacun des trois substrats cités ci-dessus est hydrolysé par l'enzyme prise au stade PC_1. Si l'hydrolyse du substrat se situe entre 20 et 60 %, ce qui est vérifié par traitement au TCA d'aliquotes prélevées à temps différents, le milieu de digestion est chargé aussitôt sur une colonne de DEAE-Séphadex A-25, développée ensuite comme il est décrit dans les méthodes (Tener, 1967). Rappelons que ces colonnes, réalisées en milieu dénaturant, séparent les produits en fonction de la valeur de leurs charges négatives, c'est-à-dire du nombre de phosphates présents, donc approximativement de la taille. On peut ainsi résoudre de 1 à quelques nucléotides dans le gradient en NaCl. Les fragments de grande taille ainsi que les polymères, sont désorbés de la colonne avec du NaCl 1 M et de la soude 0.1 N. Le repérage des tailles est réalisé grâce à des molécules de référence (mono, di, tri, tétranucléotides, etc...) quel'on rajoute à l'hydrolysat radioactif et qui sont ensuite détectés par mesure de la densité optique à 260 nm. Les Fig. 20, 21 et 22 donnent les résultats obtenus avec le $|^{32}P|$ poly r(AU), le $|^{3}H|$ poly r(G) -

FIGURE 20 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D (avant le stade DEAE-cellulose). Séparation sur DE A-25.*

0.5 nmole de $|^{32}P|$ poly r(AU) sont incubées avec 3 µg de protéines prises au stade PC_1 pendant 45 min à 37° (le taux d'hydrolyse est de 50 %). Le milieu de digestion est additionné de 1.68 g d'urée, 0.4 µ mole de 5'UMP complété à 4 ml avec de l'eau et chargé sur la colonne de A-25 (0.8 x 20 cm) développée ensuite comme il est décrit dans les méthodes. (La colonne n'a pas été lavée par la soude 0.1 N).

—●— $|^{32}P|$ poly r(AU) incubé avec l'enzyme

···●··· $|^{32}P|$ poly r(AU) incubé sans enzyme

— — — profil de 5'UMP

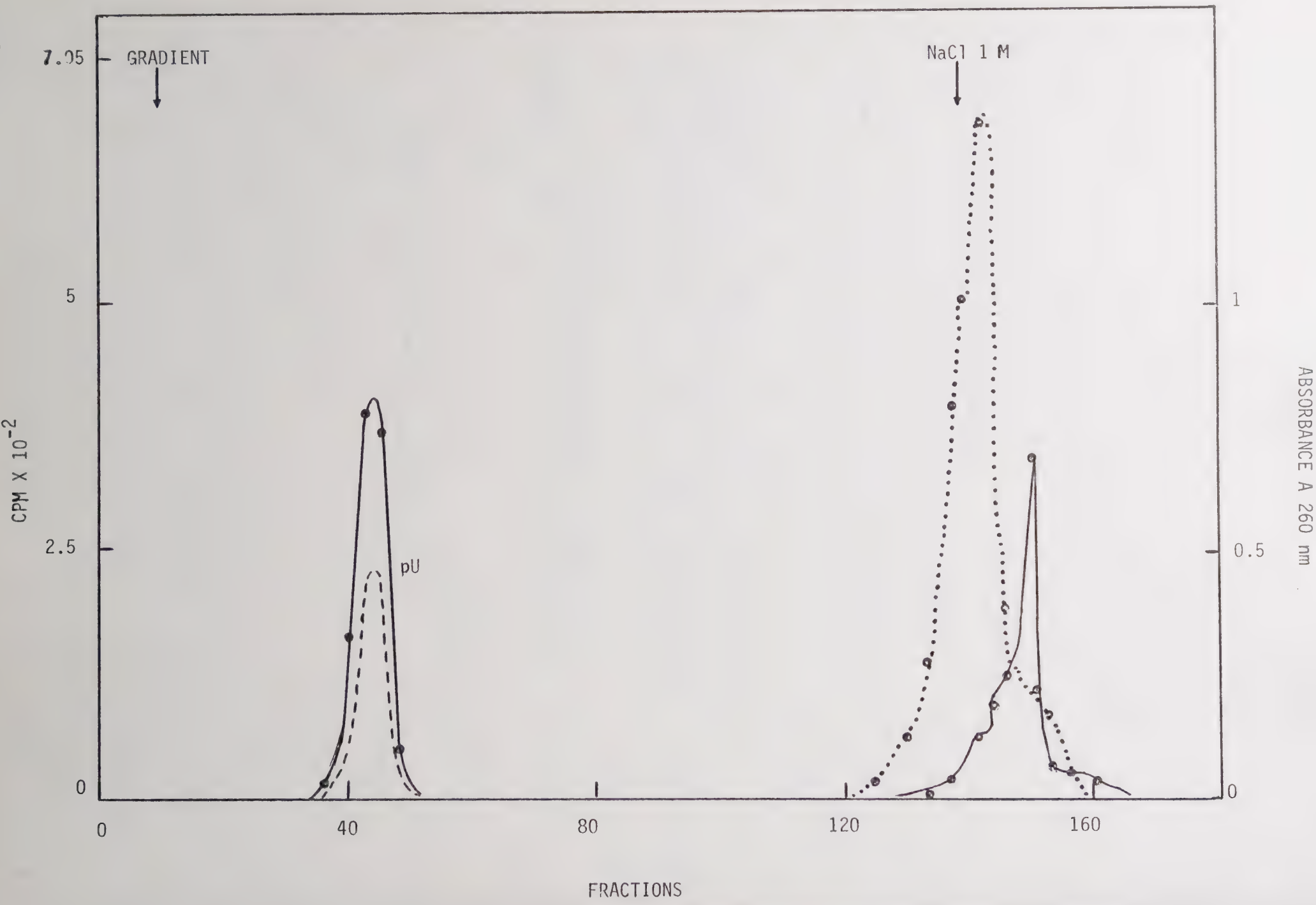

GRADIENT
NaCl 1 M
pU
CPM X 10^{-2}
7.05
5
2.5
0
ABSORBANCE A 260 nm
1
0.5
0
0
40
80
120
160
FRACTIONS

FIGURE 21 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D (avant le stade DEAE-cellulose). Séparation sur DE A-25.*

0.5 nmole de $|^3H|$ poly r(G)-poly r(C) sont incubées dans les mêmes conditions que dans la figure 20. (Taux d'hydrolyse 60 %). Le mélange à séparer est additionné de 3'GMP et 5'GMP (0.4 µmole) avant passage sur la colonne. (La colonne n'a pas été lavée par la soude 0.1 N)

—●— $|^3H|$ poly r(G)-poly r(C) incubé avec enzyme

··●·· $|^3H|$ poly r(G)-poly r(C) incubé sans enzyme

– – – profil de 3'GMP et 5'GMP

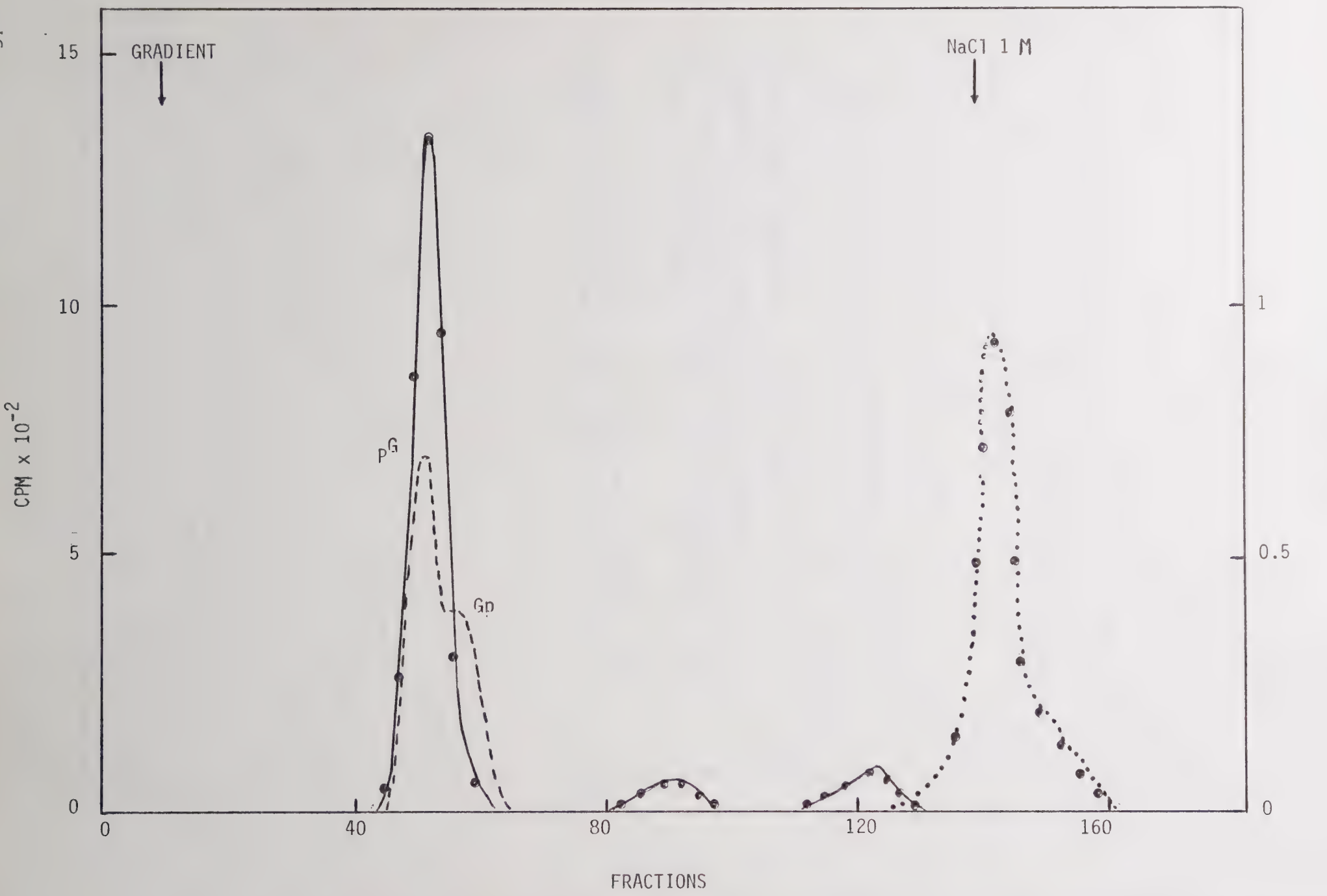

GRADIENT
NaCl 1 M
pG
Gp
CPM x 10^{-2}
ABSORBANCE A 260 nm
FRACTIONS
0
5
10
15
0
0.5
1
0
40
80
120
160

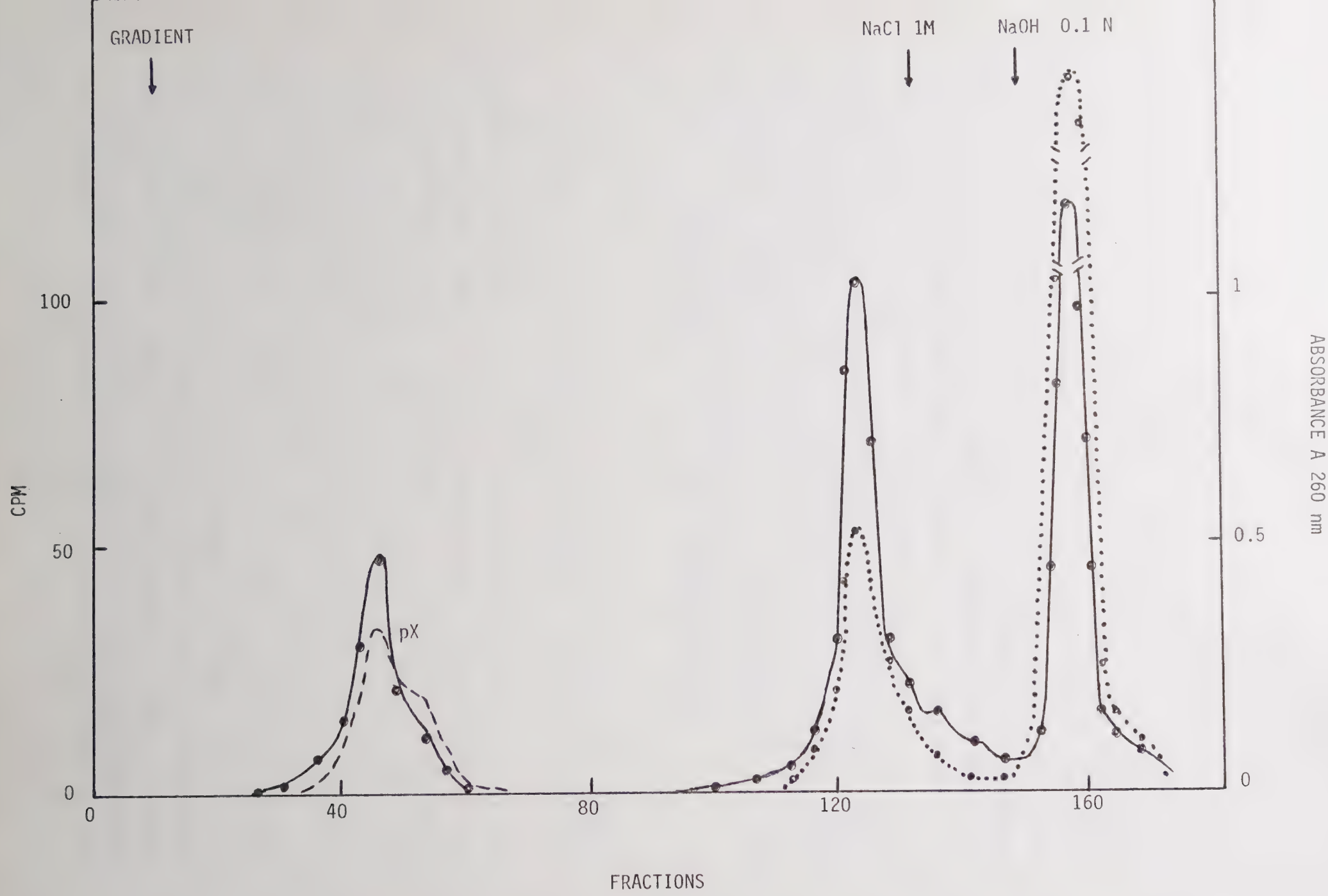
FIGURE 22 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D (avant le stade DEAE-cellulose). Séparation sur DE A-25.*

72 nmoles de $|^{32}P|$ RNA de phage $\phi 6$ sont incubées avec 180 µg de protéines prises au stade PC_1 pendant 60 min à 37° (Taux d'hydrolyse 20 %). L'hydrolysat est additionné de 0.4 µmole de chacun des nucléotides 5'P avant séparation.

—●— RNA incubé en présence d'enzyme

··●·· RNA incubé en absence d'enzyme

- - - profil des mononucléotides.


GRADIENT
NaCl 1M
NaOH 0.1 N
pX
CPM
100
50
0
0
40
80
120
160
FRACTIONS
1
0.5
0
ABSORBANCE A 260 nm

poly r(C) et le $|^{32}P|$ RNA de ϕ6. Dans ces trois graphiques il apparaît un pic de mononucléotide. Ils ont le phosphate en position 5' car, pour une base donnée, le résidu 5'P est élué avant le 3'P, comme le montre le profil de densité optique. Une preuve supplémentaire est apportée par le $|^{32}P|$ poly r(AU). Celui-ci a été synthétisé en présence de $|^{32}P|$ α-UTP. La production de mononucléotide 3'P à partir d'un tel substrat implique nécessairement que le phosphate radioactif soit transféré sur la base voisine c'est-à-dire l'adénosine. Or un hydrolysat de $|^{32}P|$ poly r(AU) déposé sur papier Wathman 3MM et soumis ensuite à une électrophorèse (4000 volts 45 min) en tampon pyridine-acide acétique pH 3.5, montre que le seul nucléotide radioactif est l'UMP. Pour le poly r(AU) et le RNA de ϕ6 nous ne trouvons pas d'autre produit de taille supérieure au mononucléotide ; le matériel élué à la fin du gradient est difficile à identifier car il se retrouve aussi dans l'essai témoin. Dans le cas du poly r(G) - poly r(C) nous observons des traces de tétra ou pentanucléotide.

Il faut donc conclure que quelque soit le substrat, l'extrait enzymatique non passé sur DEAE-cellulose ne donne pratiquement qu'un seul produit : des mononucléotides 5'P.

b) Après le stade de purification sur DEAE-cellulose

Lorsque nous refaisons les mêmes expériences que celles décrites ci-dessus mais avec l'enzyme au stade ultime de purification, les résultats montrent qu'il n'y a plus trace de mononucléotide. Or la vérification parallèle de l'hydrolyse montre qu'une fraction du substrat a été rendue acido-soluble par le traitement au TCA donc, que l'activité RNAse D était présente.

Il faut donc admettre que les mononucléotides observés ne sont pas directement issus de l'action de la RNAse D qui couperait donc le RNA à la manière d'une endonucléase. Les fragments issus de cette action deviendraient alors substrat pour l'exonucléase qui libèrererait les mononucléotides observés. Nous avons vérifié qu'un éluat 0.1 M KCl de colonne de DEAE-cellulose, obtenu en cours de purification, est incapable de libérer des mononucléotides à partir du poly r(AU) dans nos conditions, mais qu'il peut en redonner si on lui rajoute un peu de la fraction non retenue sur DEAE (expérience faite sur le $|^{32}P|$ poly r(G) - poly r(C) avec détection de 5' GMP en électrophorèse sur papier). Comme nous l'avons dit, nous pensons qu'il s'agit de l'exonucléase décrite par Lazarus et Sporn (1967). Il ne fait pas de doute

pour nous que c'est uniquement une enzyme contaminante à qui on ne peut attribuer une quelconque spécificité d'hydrolyse du dsRNA.

Si la RNAse D est une endonucléase elle doit opérer des modifications de taille du substrat que la technique doit permettre de révéler.

L'analyse sur DE A-25 s'est avérée pratiquement inefficace. Avec le $|^{32}P|$ poly r (AU) nous avons obtenu le résultat illustré Fig. 23. Nous avons apparition d'un matériel élué après l'ATP et qui pourrait avoir la taille de 5 à 6 nucléotides. On peut cependant s'étonner de ne pas trouver d'espèces intermédiaires entre ce matériel et le reste du substrat. Avec le RNA de $\phi 6$ nous obtenons (comme Fig. 22) un matériel élué en fin de gradient et un autre élué par traitement au NaCl 1 M ou à la soude 0.1 N. On peut seulement noter une variation des proportions de ces pics selon que le substrat est traité ou non par l'enzyme.

On peut penser que deux raisons au moins peuvent justifier ces résultats :

- le pouvoir de séparation de la colonne n'est réel que pour des petits fragments et, le substrat partiellement dégradé et non dégradé peuvent être élués en même temps,

- l'enzyme peut couper les deux chaînes du substrat sans les couper forcément au même endroit. Ceci peut entraîner un non effondrement de la structure qui serait mal ou pas du tout dénaturée par l'urée. Les petits fragments resteraient alors solidaires de l'ensemble. Ceci est quand même partiellement contradictoire avec le fait que l'exonucléase les reconnaitrait comme segments simple chaîne. Nous avons donc essayé d'autres techniques d'analyse.

Filtration sur gel. Des filtrations sur colonne de Séphadex G-75 ou G-50 (0.8 x 60 cm) en tampon A-25 de $|^{3}H|$ poly r(AU) montrent que le substrat non hydrolysé est exclu. Après traitement par l'enzyme, ce pic diminue en quantité, mais la radioactivité paraît se diluer dans tout l'effluent sans focaliser.

Ultracentrifugation en gradient de sucrose. Du $|^{32}P|$ poly r(AU) hydrolysé par l'enzyme purifiée est déposé sur un gradient en saccharose 5-20 % dans un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.6, EDTA 0.001 M, SDS 1 % et

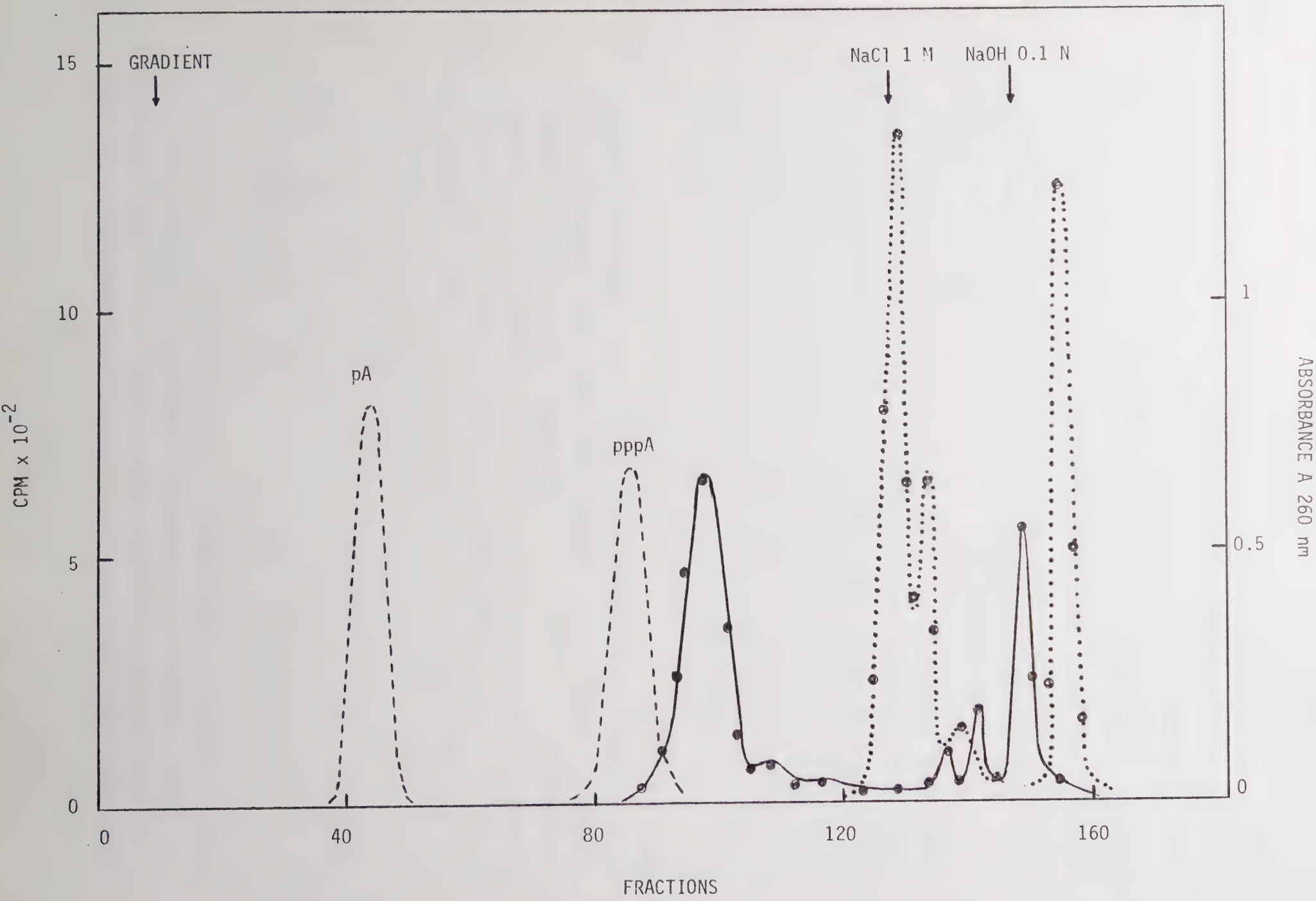
FIGURE 23 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D (après le stade DEAE-cellulose). Séparation sur DE A-25.*

0.18 nmoles de $|^3H|$ poly r(AU) sont incubées avec 3 µg de protéines au stade PC_3 (taux d'hydrolyse 55 %). La digestion est additionnée de 0.4 µmole de 5'AMP et 5'ATP.

—●— $|^3H|$ poly r(AU) traité

··●··· $|^3H|$ poly r(AU) témoin

– – – profil des nucléotides


GRADIENT
NaCl 1 M
NaOH 0.1 N
pA
pppA
15
10
5
0
CPM x 10^{-2}
1
0.5
0
ABSORBANCE A 260 nm
0
40
80
120
160
FRACTIONS

centrifugé pendant 15 heures à 37 000 RPM. On voit que dans ce milieu favorable à la dénaturation par absence de force ionique il y a un léger glissement vers le haut du gradient de l'ensemble des molécules de substrat avec une augmentation sensible de l'hétérogénéité en taille (Fig. 24).

Electrophorèses. Lorsqu'un hydrolysat de $|^{32}P|$ poly r(AU) est soumis à migration électrophorétique sur un gel discontinu (5 % et 10 % en acrylamide en tampon Tris-HCl 0.04 M pH 7.4, acétate de sodium 0.01 M, EDTA 0.001 M, on observe le résultat donné Fig. 25. Il n'est pas sans rappeler celui obtenu par la centrifugation en gradient de saccharose car, là encore, nous voyons que l'enzyme produit un léger glissement de l'ensemble des molécules, sans accumulation de produits de petite taille définis. Nous avons aussi réalisé cette dernière expérience en dénaturant l'échantillon à analyser par chauffage (5 min à 60°) en présence de 50 % de formamide et 2.2 M formaldéhyde (Hewlett et al., 1977). L'électrophorèse est alors réalisée en tampon phosphate (PO_4HNa_2 0.018 M, PO_4H_2Na 0.002 M) dans un gel contenant 2.2. M de formaldéhyde. Les résultats n'apportent pas de renseignements supplémentaires.

L'inconvénient du poly r (AU) et du poly r(G) - poly r(C) dans ce genre d'étude est que les molécules substrat elles-mêmes sont hétérogènes en taille comme le montre l'électrophorèse et ceci ne peut que nuire à la détection des produits de coupure. Le RNA de phage $\phi 6$ ne présente pas cet inconvénient car il est composé de trois molécules dont les tailles sont : 4.28, 2.87, 2.10^6 daltons. (Van Etten et al., 1974). Ces trois espèces sont parfaitement séparées en gel d'agarose 1.5 %. Avec ce RNA nous avons réalisé trois sortes d'expériences :

- Du RNA radioactif ou non radioactif est hydrolysé par l'enzyme. Après extraction par le phénol-SSC en milieu SDS, les produits à séparer sont déposés sur une plaque de gel d'agarose 1.5 % (épaisseur 2 mm) reposant sur un coussin acrylamide 10 %. L'électrophorèse est faite en tampon Tris-HCl 0.004 M pH 7.4, acétate de sodium 0.01 M, EDTA 0.001 M, glycérol 10 % (Hewlett et al., 1977). Après migration (300 V pendant 3 heures) le gel est autoradiographié ou immergé dans un bain de BET pour visualiser le RNA sous lumière ultraviolette. Il ne nous a jamais été possible de déceler une modification de migration dans aucune des trois espèces ni de faire apparaître des produits

FIGURE 24 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D (après le stade DEAE-cellulose). Ultracentrifugation en gradient de saccharose.*

0.5 nmole de $|^{32}P|$ poly r(AU) sont incubées avec 10 µg de protéines au stade PC_3 pendant 30 min à 37°. La digestion est arrêtée par addition de SDS (1 % final). L'essai témoin est réalisé en ajoutant le SDS au temps 0 de l'incubation à un essai complet (Contrôle de la digestion : 30 % d'acido soluble). Chaque mélange est déposé sur un gradient linéaire en saccharose 5 à 20 % p/p dans un tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.6, EDTA 0.001 M, SDS 1 %. La centrifugation est faite à 20° pendant 15 heures à 37000 RPM (Rotor SW 40). Après récolte les fractions sont comptées par effet Cerenkov.

●——● $|^{32}P|$ poly r(AU) traité par l'enzyme

○——○ $|^{32}P|$ poly r(AU) non traité par l'enzyme

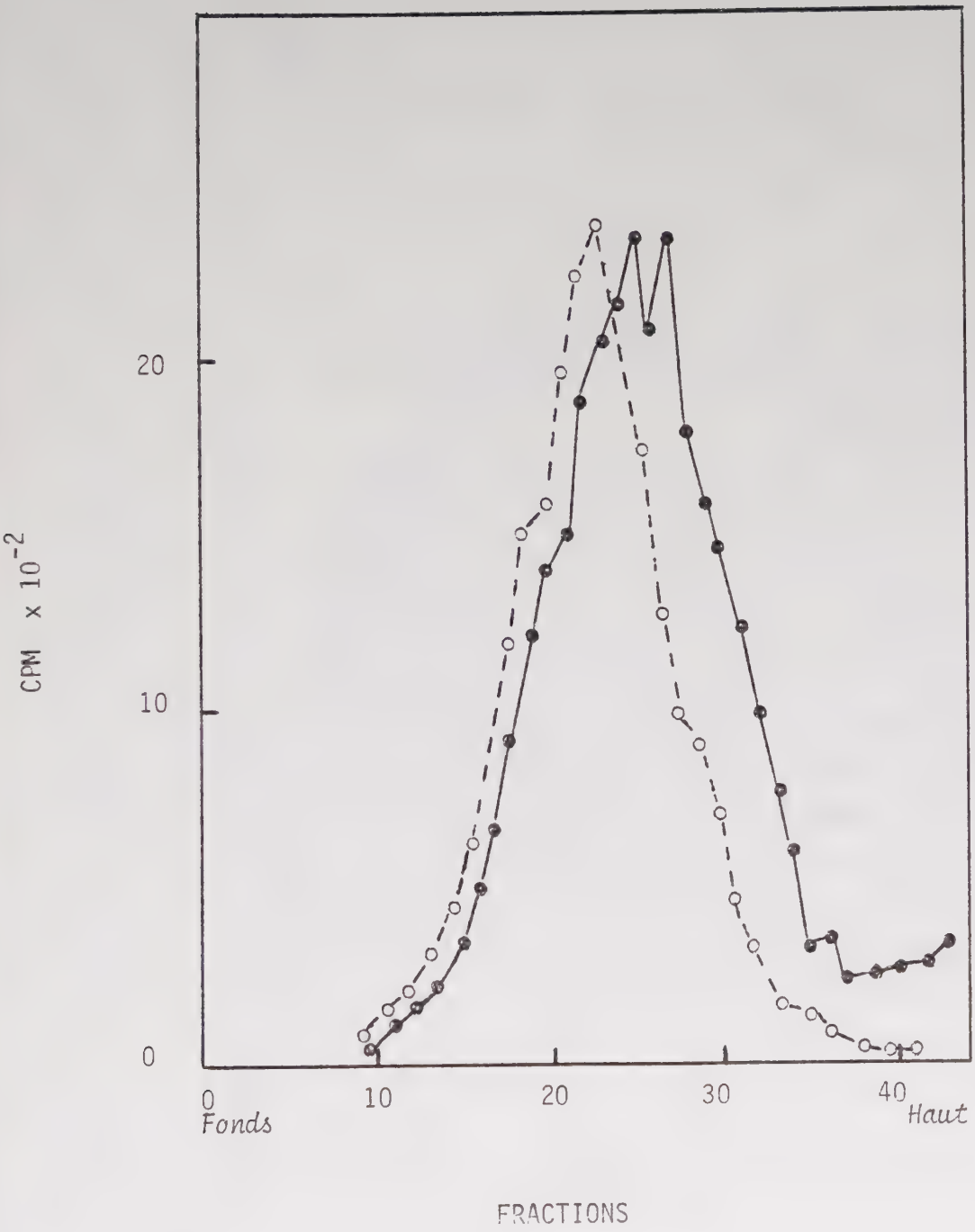
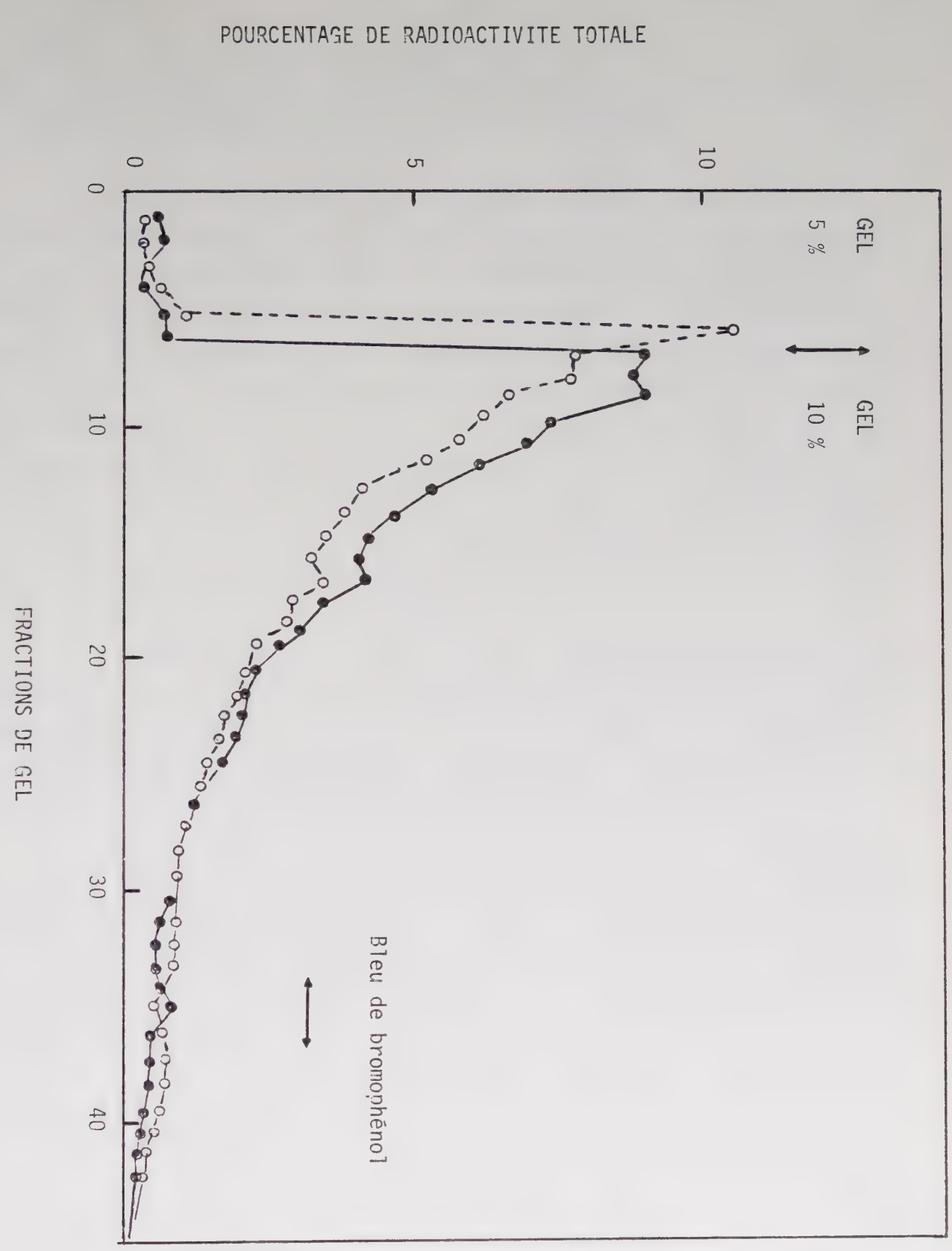

CPM x 10^{-2}
20
10
0
0
10
20
30
40
Fonds
Haut
FRACTIONS

FIGURE 25 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D (après le stade DEAE-cellulose). Séparation en électrophorèse.*

0.84 nmole de $[^{32}P]$poly r(AU) sont hydrolysés par 12 µg de protéines rajoutées en trois fois au cours de l'incubation (90 min à 37°). La digestion est arrêtée par du SDS (1 % final) et le RNA est extrait par du phénol saturée de SSC (Contrôle de l'hydrolyse : 42 %). La phase aqueuse est séchée sous vide et redissoute dans 15 µl de saccharose 30 % contenant 0.5 % de bleu de Bromophénol. La plaque d'électrophorèse (20 x 20 x 0.2 cm) est constitutée par un gel 10 % en acrylamide surmonté par 2 cm de gel 3 %. Le tampon d'électrophorèse est Tris-HCl 0.04 M pH 7.4, acétate de sodium 0.01 M, EDTA 0.001 M (Winicov et Perry, 1974). La migration est réalisée pendant 5 heures à 30 mA et de telle façon qu'aucun produit ne puisse sortir du gel. Le gel est congelé, découpé en tranches qui sont comptées par effet Cerenkov.

●——● Substrat incubé avec l'enzyme

○——○ Substrat non incubé.


POURCENTAGE DE RADIOACTIVITE TOTALE
0
5
10
GEL 5 %
GEL 10 %
Bleu de bromophénol
0
10
20
30
40
FRACTIONS DE GEL

migrant plus bas dans le gel. Pourtant le contrôle de l'hydrolyse effectué sur l'échantillon radioactif avait signalé 38 % d'hydrolyse.

- Le RNA non marqué (0.1 à 0.2 µg) est incubé à 37° avec ou en absence de RNAse D. Après extraction par le phénol-SSC, la phase aqueuse est dialysée extensivement contre un tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, EDTA 0.01 M. Le RNA est ensuite examiné au microscope électronique, après coloration et ombrage. Cette expérience a aussi été réalisée avec un RNA enrichi en grandes molécules ($4.78\ 10^6$ daltons) par ultracentrifugation du RNA total en gradient de saccharose (Van Etten et al., 1974). La microscopie électronique montre que les longueurs trouvées pour chaque espèce dans l'échantillon témoin correspondent à celles données dans la littérature (Semancik et al., 1973). Cependant l'étude statistique des tailles montre que les molécules de l'échantillon hydrolysé (Fig. 27) ne sont pas significativement plus courtes que celles qui n'ont pas été traitées par la RNAse D (Fig. 26).

Cette technique ne peut mettre en évidence des coupures qui laissent la possibilité aux deux brins de rester appariés (le matériel n'a pas été dénaturé avant examen au microscope). Elle ne peut également montrer un raccourcissement des molécules qui serait inférieur à la limite de résolution de la technique (60 à 80 nucléotides minimum).

- Le RNA non marqué est hydrolysé par la RNAse D, traité successivement par la phosphatase alcaline, la polynucléotide kinase en présence de $|^{32}P|$ γ-ATP puis soumis à électrophorèse. Ces expériences qui visaient à mettre en évidence les produits de coupure grâce à leur extrémité 5' radioactive n'ont pu apporter d'élément de réponse.

c) Conclusion

Apparemment on note une discordance entre le % d'acido soluble mesuré parallèlement par la précipitation au TCA et les modifications de taille révélées par l'ensemble des techniques. Il est possible que la puissance de dénaturation du TCA n'ait pu être égalée dans les diverses méthodes de séparation. A l'inverse, il nous paraît peu vraisemblable que l'agrégation ou la non dénaturation soient uniquement à l'origine des résultats observés. Il ressort que la RNAse D, qui agit comme une endonucléase, ne fait pas des réductions

FIGURE 26 et 27 : *Etude des produits de digestion. Observation au microscope électronique.*

48 µg de RNA de phage ϕ 6 sont déposés sur un gradient de saccharose 5 - 20 % p/v dans un tampon 2 SSC. Après centrifugation (Rotor SW 40, 31000 RPM pendant 14h) fractionnement et analyse à 260 nm, le matériel le plus "lourd" est précipité par l'éthanol. 0.2 µg de ce RNA est traité pendant 60 min à 37° par 10 µg de RNAse D prise au stade PC_3. En parallèle 0.2 µg de RNA est incubé sans addition d'enzyme. La digestion est stoppée par le SDS (1 % final) et le RNA est extrait par un volume de phénol-SSC. Les phases aqueuses sont dialysées contre un tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, EDTA 0.01M. Les grilles de microscopie sont ensuite préparées selon des méthodes classiques .

Ci-contre - RNA témoin (non traité par l'enzyme)
Grandissement 30.000
Longueur moyenne de la grande molécule : 1.26 µ

Ci-après - RNA traité par l'enzyme
Grandissement 30000
Longueur moyenne de la grande molécules : 1.22 µ

Les molécules circulaires super enroulées représentent le DNA de phage PM_2 introduit en référence.

E
٢
١

notoires de taille, et surtout, ne paraît pas réduire le substrat à l'état de fragments petits et de taille homogène. Ceci incline à penser que l'enzyme n'attaque pas la molécule à n'importe quel point, car on voit mal comment on pourrait éviter, statistiquement, une réduction notoire de la taille. Ajoutons à cela que du RNA de phage $\phi 6$ marqué uniquement aux extrémités 5' grâce à la polynucléotide kinase en présence de $|^{32}P|$ γ-ATP (après déphosphorylation par la phosphatase alcaline) est, comparativement, autant, sinon plus rapidement hydrolysé que le RNA marqué à l'intérieur de la chaîne. (Il a été vérifié que ce n'est pas du phosphate à l'état minéral qui est libéré). Les molécules de RNA de phage $\phi 6$ sont très longues, les chances pour que les fragments coupés contiennent effectivement le phosphate terminal radioactif sont faibles, tout au moins au début de l'incubation. Nous avons donc supposé que l'enzyme pouvait "reconnaître" l'extrémité 5' du substrat et couper un fragment la contenant. La difficulté que l'on a pour mettre ces fragments en évidence, provient peut-être du fait qu'ils sont hétérogènes en taille. Les substrats que nous avons spécialement réalisés pour élucider ce problème ($|^{3}H|$ poly r(AU) marqué au $|^{32}P|$ à l'extrémité 5', poly r(AU) synthétisé en présence de $|^{32}P|\gamma$ATP et où l'extrémité triphosphate est radioactive) n'ont pu apporter de réponse pour des raisons d'ordre technique (activités spécifiques trop faibles en particulier).

B - NATURE DES EXTREMITES

Lorsqu'une enzyme coupe à l'intérieur d'une chaîne de nucléotides, le phosphate se trouve nécessairement sur l'une ou sur l'autre des deux extrémités engendrées. Nous avons utilisé les exonucléases de mécanisme connu pour élucider ce point.

La phosphodiestérase de venin de serpent est une exonucléase qui progresse d'une manière récurrente à partir d'une extrémité 3'OH en libérant des mononucléotides 5'P. Son action est bloquée en présence d'une extrémité 3'P.

A l'inverse, la phosphodiestérase de rate progresse à partir d'une extrémité 5'OH en libérant des mononucléotides 3'P.

Le $|^3H|$ poly r(AU) est hydrolysé par la RNAse D avec ou sans addition de phosphodiestérase de venin de serpent, celle-ci étant à une concentration telle que le poly r(AU) lui-même ne soit pas dégradé. Pour un temps d'incubation donné, la dégradation du substrat est nettement accrue en présence de phosphodiestérase (Fig. 28). Il a été vérifié d'autre part que des mononucléotides sont libérés. A l'inverse la phosphodiestérase de rate ne modifie pas la cinétique de dégradation du poly r(AU) par la RNAse D.

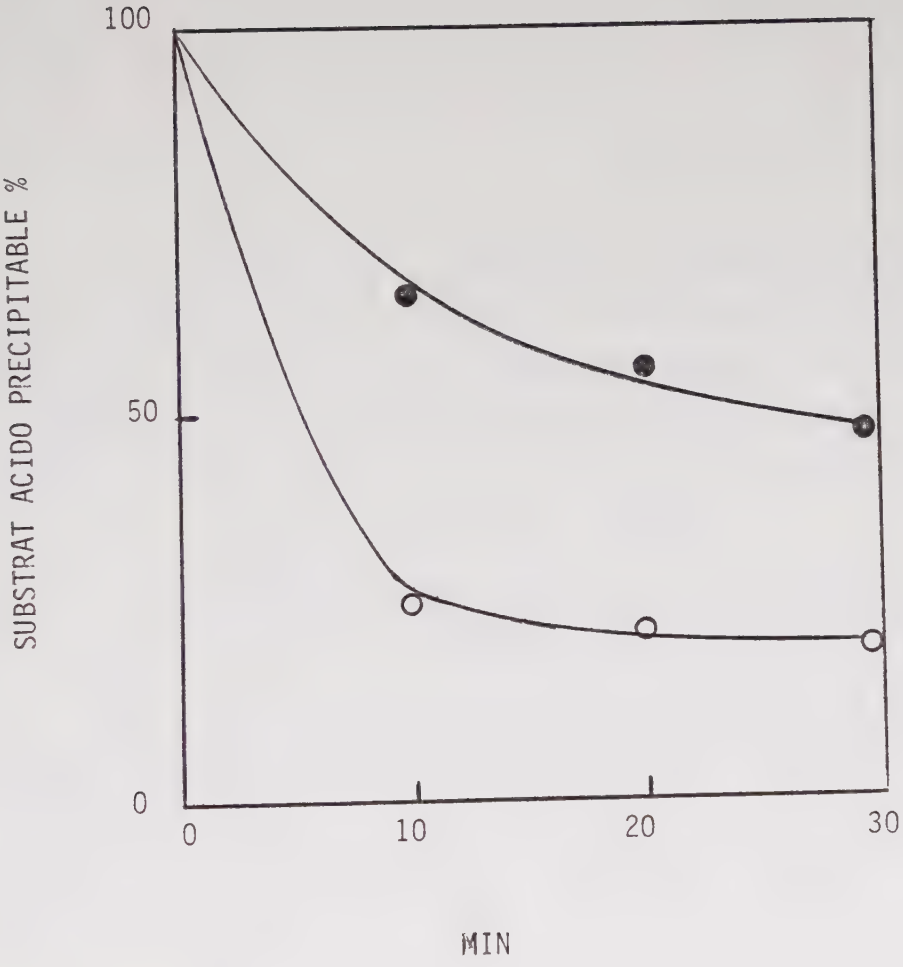
Nous pensons donc que les coupures de la RNAse D engendre des extrémités 3'OH et 5'P.

FIGURE 28 : *Etude des produits de digestion de la RNAse D.*
Nature des extrémités.

0.05 nmole de $|^{32}P|$ poly r(AU) sont incubées pendant les temps indiqués avec 0.5 µg de protéines au stade PC_3 (RNAse D) et :

●——● sans addition

○——○ 0.1 µg de phosphodiestérase de venin de serpent.


100
50
0
0
10
20
30
SUBSTRAT ACIDO PRECIPITABLE %
MIN

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA MATURATION DE RNA PRECURSEURS EUCARYOTES

Ce chapitre ne prétend pas résoudre le délicat problème du ou des rôles de la RNAse D dans la cellule. Nous espérons qu'elle intervient dans la maturation d'une ou plusieurs espèces de RNA et de ce fait nous avons essayé de réaliser des expériences pouvant incliner vers cette hypothèse. Ces expériences permettent en outre de juger la qualité de nos préparations de RNAse D.

Nous avons choisi comme systèmes :

- Le RNA précurseur 45S dont sont issus les espèces ribosomales 18S et 28S à travers une série de coupures et de produits intermédiaires.

- Les particules ribonucléoprotéiques nucléaires (hnRNP) qui contiennent le RNA prémessager et doivent en conséquence être le siège de plusieurs événements de maturation. En outre il a été montré que le hnRNA possède des régions double chaîne (Montagnier, 1968) (Jelinek et Darnell, 1972) (Robertson et al., 1977) qui existent probablement dans cet état in vivo (Calvet et Pederson, 1977).

On ne peut s'éviter de relier ce fait à la spécificité de la RNAse D. Nous avons vu d'ailleurs que ces régions isolées constituent un excellent substrat pour l'enzyme.

Dans ce domaine l'expérimentation a été envisagée sous deux aspects.

- D'une part nous avons recherché des modifications de taille dans le hnRNA après action de la RNAse D sur la particule,

- D'autre part la structure et la conformation de ces régions double

chaîne ont été appréhendées au sein même de la particule par analyse du signal de fluorescence du BET intercalé dans ces structures. Nous avons regardé comment pouvait être modifié ce signal après action de la RNAse D. C'est ce que nous essayerons de résumer.

A - CLIVAGE DU RNA PRERIBOSOMAL 45S

a) Obtention du RNA $|^{32}P|$ 45S

Les cellules HeLa sont marquées au $|^{32}P|$ comme il est décrit dans les "Méthodes" au paragraphe *A*-e sauf que l'on supprime l'actinomycine D.

Après récolte et lavage, les cellules sont additionnées de 10 volumes de tampon acétate de sodium 0.01 M pH 5, SDS 1 %. Le RNA total est extrait trois fois à 55° par du phénol saturé d'eau et précipité par l'éthanol (Scherrer et al., 1962). Le RNA $|^{32}P|$ 45S est purifié par trois cycles de centrifugation décrits Fig. 29 (Jeanteur et al., 1968).

b) Digestion par la RNAse D

Nous avons soumis le RNA $|^{32}P|$ 45S à l'action de la RNAse D d'ascite en présence ou en absence de BET ainsi qu'à celle de la RNAse III de E. Coli pour introduire un élément de comparaison. Le protocole expérimental des incubations est décrit Fig. 30.

c) Résultats

L'autoradiographie du gel (Fig. 30) montre que la RNAse D (puits 2) clive le RNA 45S en un nombre fini de fragment qui se regroupent essentiellement en trois familles de taille : une qui est centrée autour de la position du RNA 28S, une qui est sensiblement plus grande que le 18S, une qui est nettement plus petite que le 18S. Une 2ème expérience semblable a fourni des résultats identiques ce qui tend à prouver que des sites préférentiels de coupure existent pour l'enzyme au niveau du précurseur. Comme il est net que le BET

FIGURE 29 : *Préparation du RNA préribosomal* $|^{32}P|$ 45S

A - Le RNA total cellulaire issu de l'extraction au phénol est dissous dans 200 µl de tampon acétate 0.01 M pH 5, 0.1 M NaCl, déposé sur un gradient de saccharose 5-20 % dans ce tampon et centrifugé pendant 14 h à 19.000 RPM (Rotor SW 40). Les flèches indiquent la position des RNA 28S et 18S centrifugés dans les mêmes conditions.

B - Le RNA de la fraction 1A est précipité par l'éthanol, redissous dans un tampon Tris-HCl 10^{-3}M pH 7, EDTA 2.5 10^{-4}M, chauffé à 80° pendant 3 min, refroidi à 0° et déposé sur gradient de saccharose 5-20 % dans le tampon ci-dessus. La centrifugation est réalisée 21h à 25000 RPM dans le rotor SW 27-1.

C- Le RNA de la fraction 1B précipité par l'éthanol est à nouveau centrifugé sur un gradient dans les conditions décrites en A. C'est le RNA de la fraction C que nous avons utilisé.

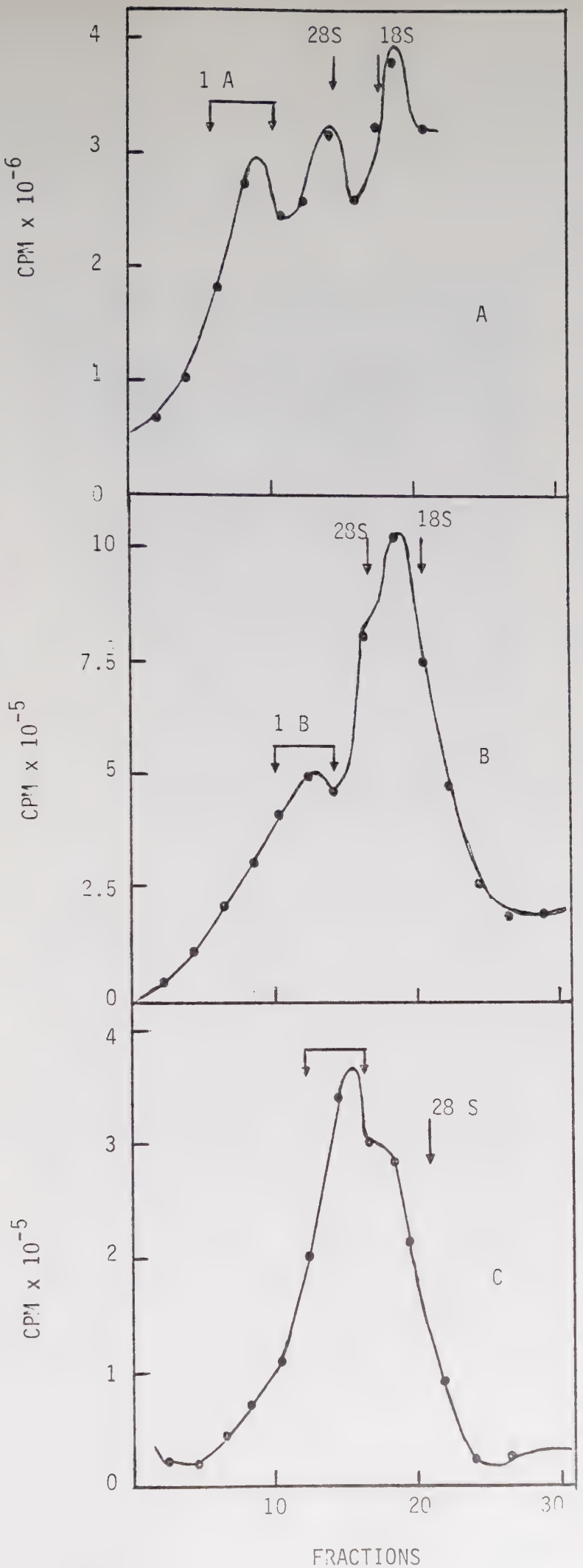
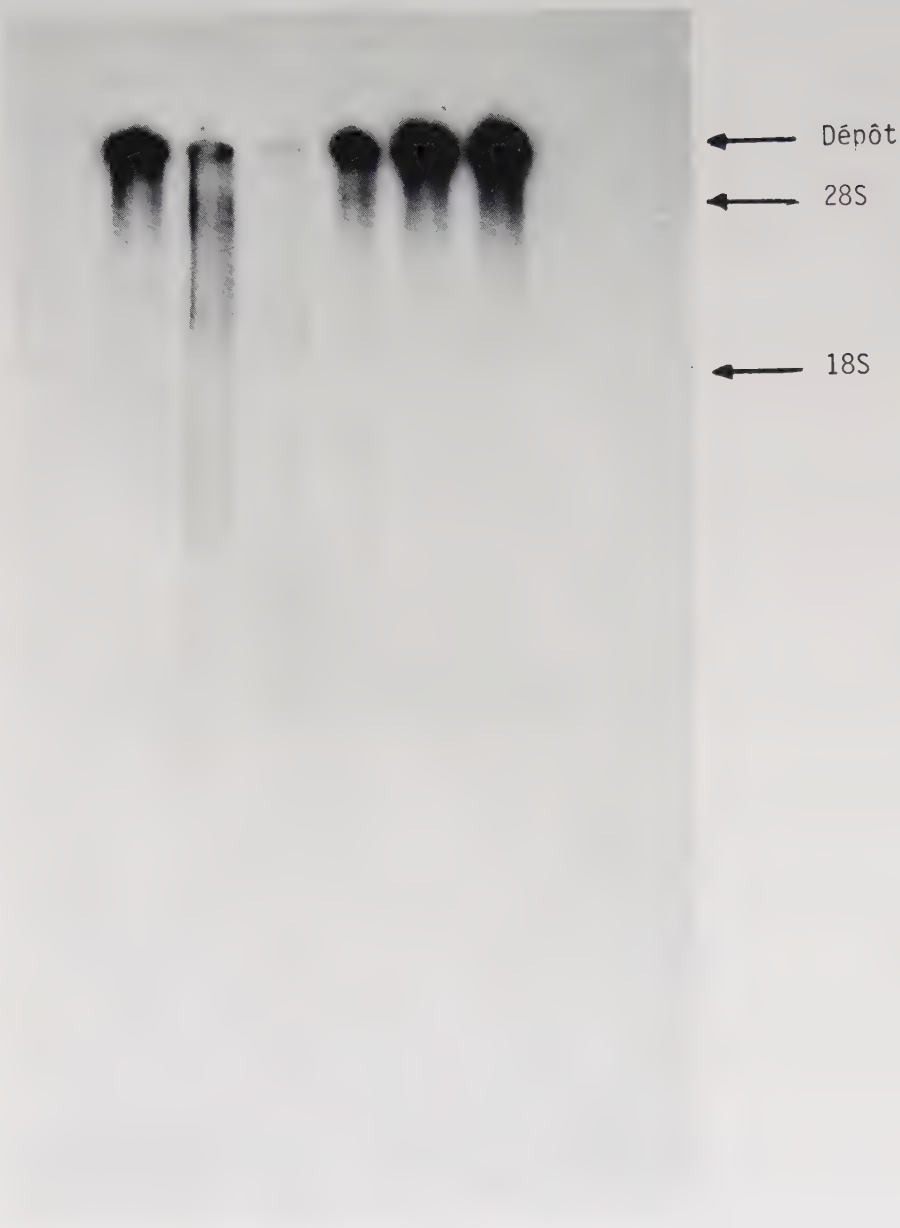

28S
18S
1 A
A
CPM x 10^{-6}
4
3
2
1
0
28S
18S
1 B
B
CPM x 10^{-5}
10
7.5
5
2.5
0
28 S
C
CPM x 10^{-5}
4
3
2
1
0
10
20
30
FRACTIONS

FIGURE 30 : *Etude de maturation. Clivage du RNA préribosomal* $|^{32}P|$ *45S.*

Tous les échantillons contiennent dans 100 µl de tampon (Tris-HCl 0.002 M pH 7.5, KCl 0.125 M, $Mg(Ac)_2$ 0.005 M) 20.10^3 cpm de RNA 45S et les additions suivantes :

1 et 6 néant
2 0.5 Unité de RNAse D
3 0.5 Unité de RNAse III (E. Coli)
4 0.5 Unité de RNAse D et BET 10^{-5}M
5 BET 10^{-5}M

Après 15 min à 37° les essais sont additionnés de SDS (1 % final) et de tRNA (100 µg/ml). Le RNA est extrait par un volume égal de phénol saturé de SSC puis précipité par l'éthanol. Après centrifugation les culots sont redissous dans le tampon d'électrophorèse dilué 10 fois et contenant 15 % de glycérol et 0.1 % de bleu de bromophénol. Tous les échantillons sont additionnés de 5 µg de RNA ribosomal total eucaryote puis sont déposés sur un "slab" gel d'acrylamide 3 % (20 x 20 x 0.2 cm). L'électrophorèse est réalisée en tampon Tris-borate-SDS pH 8.3 (10,8 % de Tris base, 5.5 % d'acide borique, 0.93 % d'EDTA disodique (Peacock et Dingman, 1967).
Après migration (5h à 300 V) le gel est immergé dans un bain contenant 1 µg /ml de BET et les molécules 28S et 18S sont repérées sous lumière U.V. La plaque est ensuite séchée et mise à l'autoradiographie.


Dépôt
28S
18S
1
2
3
4
5
6

(puits 4) inhibe pratiquement tout clivage, on peut supposer que les sites de coupure ou de reconnaissance impliquent les structures secondaires du RNA, ce qui paraît satisfaisant étant donné la spécificité de coupure de la RNAse D. On sait que les RNA 28S et 18S dérivent du précurseur par une succession de molécules de taille intermédiaire. Ceci serait en accord d'une part avec la relative hétérogénéité des tailles révélée par la largeur des bandes, d'autre part avec le fait que nous trouvons des produits plus grands que le 18S par exemple. Les résultats obtenus avec la RNAse III de E. Coli (puits 3) ne permettent pas de comparer dans la mesure où ils s'éloignent de ceux décrits dans la littérature (Gotoh et al., 1974) (Ohtsuki et al., 1977) (Torelli et al., 1977). En effet nous ne voyons pas de matériel à la position 28S et des fragments apparaissent relativement bas dans le gel.

Il faut préciser que nous n'avons pu utiliser l'enzyme la plus pure qui nous a été fournie car elle s'est révélée inactive sur le $|^3H|$ poly r(AU).

B - ACTION DE LA RNAse D SUR LES hnRNP DE CELLULES HeLa

a) Analyse de la taille du hnRNA

Les particules hnRNP sont préparées selon la méthode habituelle (Blanchard et al., 1977) à partir de cellules HeLa marquées par $H_3\ ^{32}PO_4$ comme il est décrit dans le paragraphe *A*-e des "Méthodes".

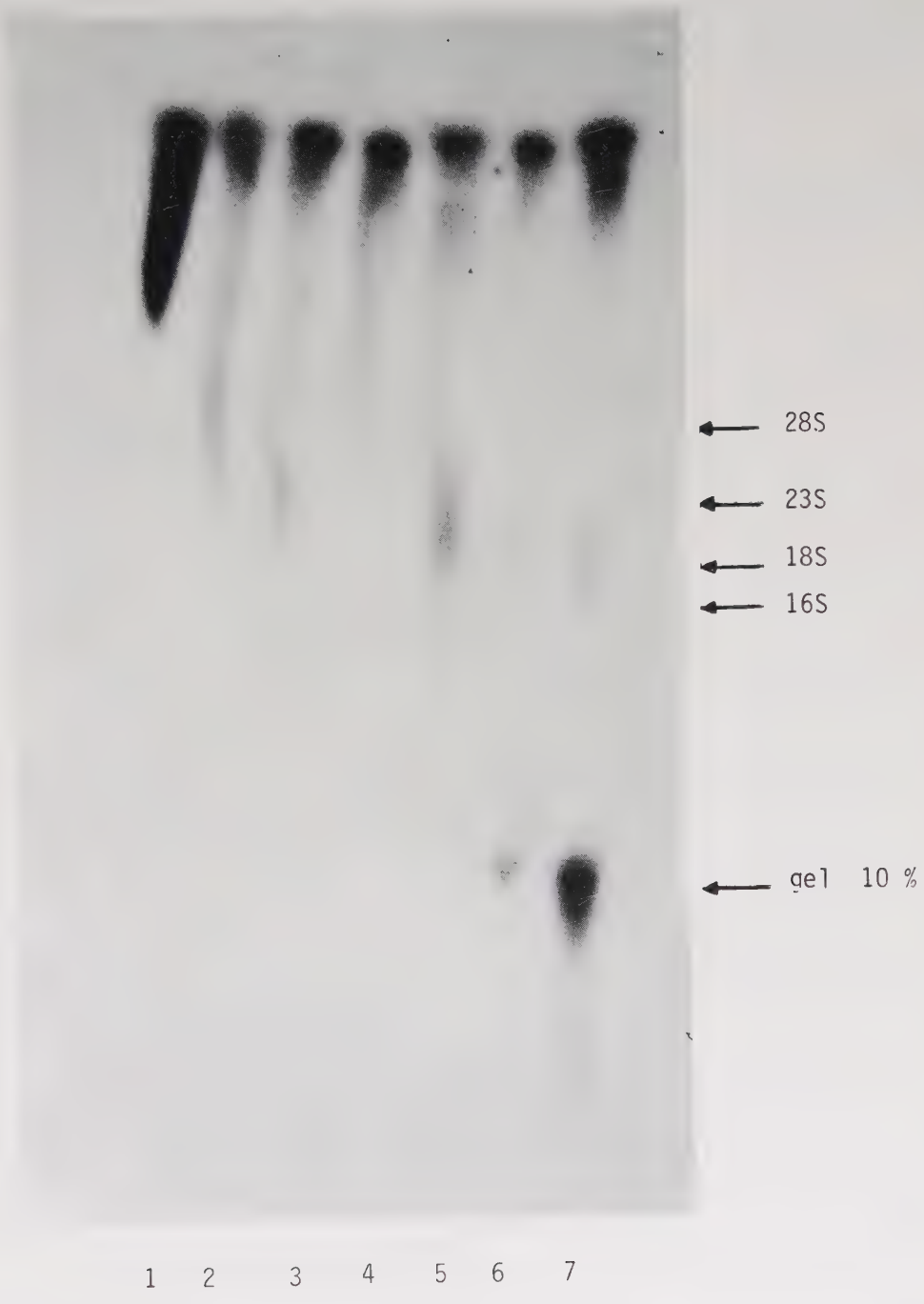
L'action de la RNAse D est exercée sur la particule native, puis le RNA est extrait et sa taille est analysée sur un gel mixte acrylamide-agarose en milieu dénaturant (Fig. 31). On constate que l'enzyme (puits 2 à 5) fait apparaître une famille de fragments dont la taille paraît se stabiliser entre 23 et 18S. Ce clivage ne semble pas imputable à une banale dégradation dans la mesure où nous observons une bande large mais discrète, sans effet de traînée se prolongeant jusqu'au fond du gel. Robertson et Dickson (1974) signalent que le hnRNA de cellules HeLa est converti en RNA 18S par action de la RNAse III de E. Coli ; c'est à quelque chose près ce que nous observons ici avec cette enzyme (puits 6 et 7).

FIGURE 31 : *Etude de maturation. Action de la RNAse D sur le hnRNA des hnRNP.*

Tous les échantillons contiennent dans 80 µl de tampon (Tris-HCl 0.02 M pH 7.5, KCl 0.125 M, $Mg(Ac)_2$ 0.005 M) 4 µg de ^{32}P hnRNP (exprimé en équivalent protéine) et les additions suivantes :

1 néant
2 0.05 Unité de RNAse D
3 0.2 " " " "
4 0.5 "
5 1 "
6 0.5 Unité de RNAse III (E. Coli)
7 1 "

Après 10 min à 37° les échantillons sont additionnés de SDS et extraits une fois par du phénol saturé de SSC, une fois par du phénol-chloroforme 4:1, v/v, une fois par du chloroforme. Les phases aqueuses sont additionnées de 5 µg d'un mélange de RNA ribosomaux, de glycérol, de bleu de bromophénol et sont déposées sur un slab gel. Celui-ci est composé d'un coussin de gel d'acrylamide 10 % surmonté par un gel mixte acrylamide 2.5 %, agarose 0.5 %. Nous avons préparé le gel et fait l'électrophorèse dans le milieu dénaturant citrate de sodium 0.025 M pH 3.5, urée 6 M décrit par de Wachter et Fiers (1972). L'électrophorèse est réalisée à t° ambiante pendant 6 h avec une intensité de 20 mA. La plaque de gel est ensuite traitée comme dans la Fig. 30 sauf que le gel n'est pas séché avant d'être mis à l'autoradiographie.


28S
23S
18S
16S
gel 10 %
1 2 3 4 5 6 7

b) Analyse de la fixation du BET

Les particules hnRNP sont incubées à 20° en présence de différentes concentrations de BET avec ou sans RNAse D. Pour chaque concentration de ligand, les fractions libre (c) et liée (r) sont déterminées au spectrofluorimètre comme il a été déjà décrit (Le Pecq et Paoletti, 1967) (Paoletti, 1971). Les résultats tracés conformément à la représentation de Scatchard (1949) sont exposés Fig. 32.

On peut constater que sur les particules natives (en absence de RNAse D) la courbe de fixation du BET est biphasique, ce qui peut être interprété de deux manières différentes au moins :

1 - Le hnRNA au niveau de la particule présente deux sites de fixation dont les constantes d'affinité, très différentes, sont dans un rapport voisin de 100. Comme la fixation du BET sur du dsRNA (ϕ6) donne une droite qui se rapproche de la courbe, région 2, il faudrait admettre que les sites 1 de plus forte affinité, seraient la conséquence de l'architecture particulaire.

2 - Le RNA contient une famille de sites présentant un effet anticoopératif. Par analogie avec ce phénomène déjà rencontré sur le DNA circulaire super enroulé (Vinograd et al., 1968), on peut penser que cet effet proviendrait d'une contrainte exercée sur le RNA, par les protéines par exemple.

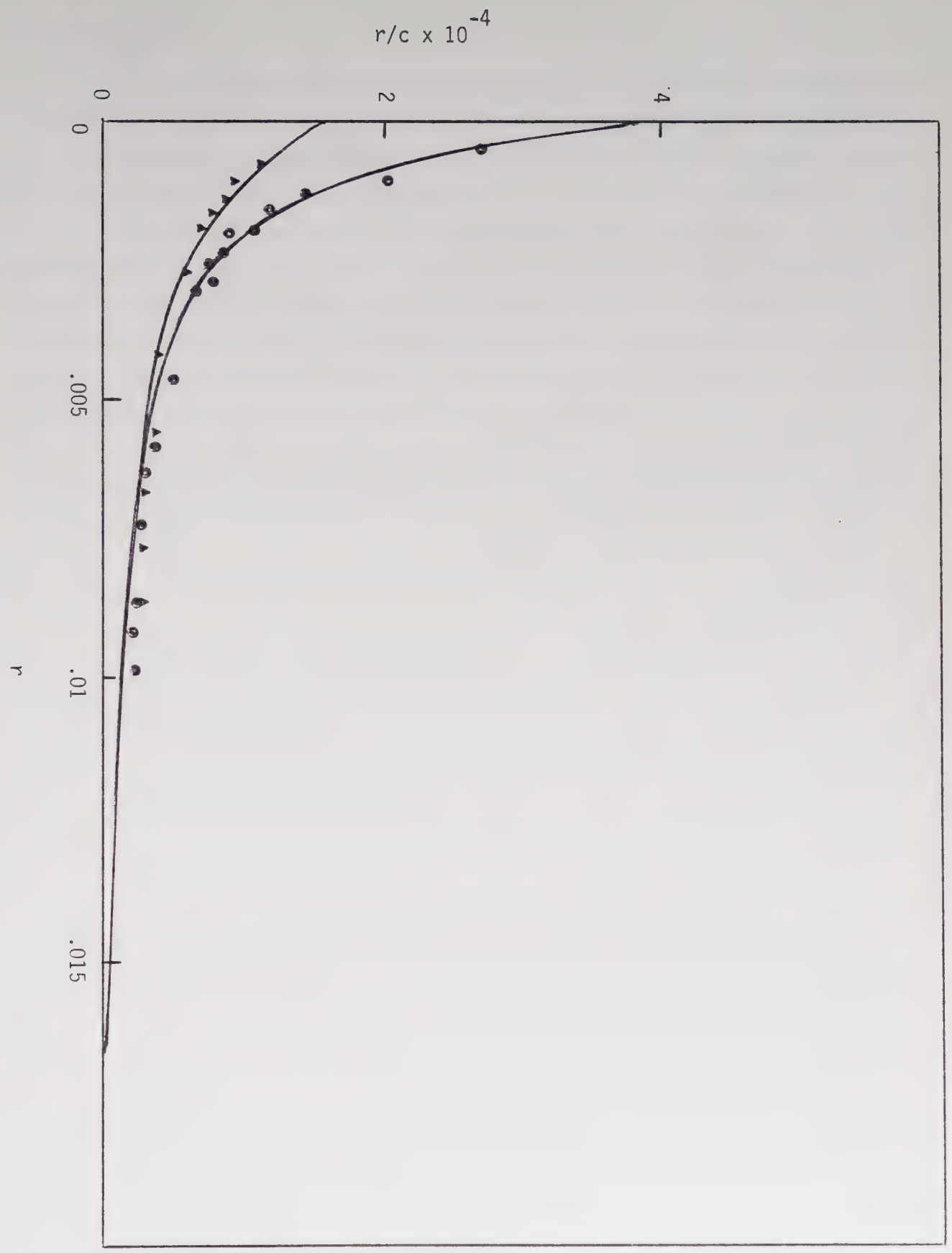
Sur les particules traitées par la RNAse D, on constate que la courbe de fixation reste d'allure biphasique, mais qu'elle est nettement modifiée dans sa 1ère partie. Selon la 1ère hypothèse, il faut admettre que l'enzyme a éliminé une partie des sites de forte affinité sans modifier substantiellement les sites 2. Selon la 2ème hypothèse, il est probable que l'enzyme en diminuant l'effet anticoopératif a supprimé une partie de la contrainte, ce qui peut se réaliser par une simple coupure à un point stratégique.
D'autres expériences seront réalisées pour tenter de choisir entre les deux modèles ; cependant, il s'avère déjà que l'action de la RNAse D, dans ce cas précis, est digne d'intérêt. Bien qu'il soit encore trop tôt pour intégrer ces derniers résultats avec ceux concernant la taille, il est possible que l'on puisse cerner l'action de la RNAse D au niveau de la particule prémessagère dans un proche avenir.

FIGURE 32 : *Etude de maturation. Fixation du BET sur les HnRNP de cellules Hela. Action de la RNAse D d'ascites.*

Les hnRNP sont incubées à 20° en présence de concentrations variables en BET. Les fractions du ligand libre (c) et liée (r) sont portées sur le graphique en représentation de Scatchard.

●——● hnRNP incubées sans RNAse D

▲——▲ hnRNP incubées avec la RNAse D.


r/c x 10^-4
0
2
4
0
.005
.01
.015
r

C - CONCLUSION

Ces dernières expériences montrent tout d'abord que la préparation de RNAse D est correcte pour effectuer une étude systématique de maturation. Ce renseignement s'appuie sur la constatation que les substrats 45S ou hnRNA ne paraissent pas être clivés au hasard en un nombre infini de fragments.

Cependant les résultats obtenus peuvent être discutés ; on peut estimer que cliver du 45S, même pour donner l'espèce 28S, comporte un côté banal. Il faut aussi prouver que les fragments obtenus correspondent aux séquences conservées dans les espèces ribosomales. Nos expériences, si elles ne prouvent pas de façon formelle la participation de la RNAse D dans le "processing" vont au moins dans le sens de cette hypothèse.

Nous espérons avoir à notre disposition un système expérimental permettant de répondre sans équivoque sur la capacité de la RNAse D d'ascites en matière de "processing".

C O N C L U S I O N

Au terme de cette étude il est permis de conclure qu'il est possible de purifier à partir des cellules d'ascites une RNAse spécifique in vitro du RNA bicaténaire. De sa confrontation avec le RNA préribosomal 45S et le hnRNA contenu dans les hnRNP, il ressort que cette RNAse D reste un candidat valable pour un des aspects de la maturation des RNA eucaryotes. De surcroît nous n'avons apparemment pas décelé dans cette enzyme de propriétés ou de caractères qui soient inconciliables avec cette fonction. Cependant il serait prématuré de conclure que la RNAse D isolée est capable de réaliser des expériences de maturation in vitro et qu'elle assure ce rôle in vivo. Cette incertitude provient de l'imperfection de notre système d'expérimentation. En effet, pour le cas qui nous intéresse en premier lieu -le hnRNA- nous avons traité la population entière et obtenu une réponse globale, digne d'intérêt certes, mais difficilement exploitable au stade expérimental. Il est probable qu'un système viral répondrait mieux à nos aspirations. En effet, les cartes de fragments de restriction possédés pour certains d'entr'eux, permettent de préparer des RNA déterminés et d'atteindre ensuite un très haut degré de finesse dans l'analyse des résultats. C'est ainsi que nous nous employons actuellement à expérimenter sur un système issu de l'adénovirus où, par ailleurs, il a été réalisé avec succès une expérience de "splicing" in vitro (Blanchard et al., 1978).

On peut se demander si la RNAse D est susceptible de recouper le messager polycistronique du phage T7 d'une manière identique à la RNAse III ; dans l'affirmative cela laisserait supposer que la RNAse D reconnaît les mêmes structures sur ce RNA. Pour notre part il ne nous a pas été possible de réaliser cette expérience avec l'enzyme telle que nous l'obtenions dans nos

ultimes préparations. A notre connaissance la littérature ne mentionne pas de telles expériences avec la RNAse D ; cependant l'enzyme issue du thymus deveau a été utilisée dans le système analogue du phage T3 (Ohtsuki et al., 1977). Les auteurs concluent que les espèces obtenues par électrophorèse en gel d'acrylamide sont comparables à celles données par la RNAse III de E. Coli.

Plusieurs auteurs n'ont pas hésité à utiliser la RNAse III pour réaliser avec des RNA précurseurs eucaryotes des essais de maturation in vitro analogues à celles que nous présentons (Robertson et Dickson, 1974) (Gotoh et al., 1974) (Torelli et al., 1977). Nous-mêmes, nous avons constamment utilisé la RNAse III soit comme référence, soit comme modèle. On peut alors s'interroger sur l'analogie de ces deux enzymes dans la limite très étroite de nos connaissances. Au rang des similitudes nous voyons des protocoles très voisins de purification avec cette constante co-purification de la RNAse H, la spécificité de substrats, les produits obtenus par traitement du RNA 45S ou du hnRNA, l'architecture moléculaire (supposée). Dans les analogies à nuancer, nous pensons que la RNAse D est plus sensible à la force ionique et moins sensible au magnésium que la RNAse III. Enfin, au chapitre des différences, notons la compétition des polymères simple chaîne, la longueur des fragments issus de la digestion d'un polymère, les activités spécifiques obtenues dans les préparations réciproques. Ces deux derniers points méritent attention. La RNAse III purifiée pour la 1ère fois par Robertson (Robertson et al., 1968) et vraisemblablement loin de la pureté protéique, présente une activité spécifique de 12 000 U/mg ; la RNAse III pure est à 40 ou 60 000 U/mg (Dunn, 1976) (Bishayée et Maitra, 1976). Bien que ces chiffres ne soient pas strictement comparables, il nous paraît que la différence est trop grande pour être négligée ; nous doutons que la RNAse D que nous préparons actuellement à 200 U/mg puisse atteindre les chiffres ci-dessus même à un stade homogène. Il semble que la RNAse D est beaucoup moins active in vitro sur un polymère bicaténaire que son homologue procaryote. Cela peut apporter une justification partielle à l'incapacité que possède la RNAse D à dégrader complètement le substrat lorsqu'il est présent en quantité notoire. A notre sens ce fait est mineur, puisque la solubilisation totale du dsRNA s'accorde mal avec le principe même de la maturation et devient paradoxalement la réaction la moins spécifique qu'effectue la RNAse III de E. Coli (Dunn et al., 1976).

Certains auteurs (Hall et Crouch, 1977) (Saha et Schlessinger, 1978) mentionnent deux RNAses D dans leur préparation. Il est difficile de répondre objectivement à cette question. Bien que l'enzyme présente presque toujours (et quel que soit l'échangeur) une élution en deux pics, nous ne possédons aucun argument expérimental supplémentaire pour affirmer l'existence de plusieurs RNAses D. Comme l'une des deux enzymes rapportées dans la littérature exhibe une forte activité sur le ssRNA et libère des mononucléotides, nous pensons qu'elle pourrait être constituée par un mélange d'exonucléase et de RNAse D analogue à celui que nous avons au stade PC_1.

Nous n'avons pas techniquement abordé la localisation intracellulaire de l'enzyme et il y a plusieurs raisons à cela. Il est pratiquement impossible avec la méthode d'homogénéisation utilisée d'éviter qu'un constituant du noyau passe dans le compartiment cytoplasmique ; par ailleurs, les méthodes de rupture des cellules en milieu non aqueux nous ont apparu difficiles à mettre en oeuvre. De surcroît l'activité RNAse D est peu ou pas décelable dans les extraits bruts et les détergents que l'on utilise classiquement pour préparer des organelles non contaminées par le cytoplasme (NP40, Triton X-100) inhibent la réaction enzymatique lorsque la concentration dépasse 0.01 %. Nous constatons qu'en homogénéisant les cellules d'ascites comme il est décrit, nous retrouvons de la RNAse D dans les extraits cytoplasmiques (Article 1, Rech et al., 1976). Le lavage des ribosomes par des solutions salines concentrées (0-0,5 M) ne montre pas d'activité RNAse D ce qui laisse supposer qu'elle n'est pas associée aux ribosomes.

Nous pensons qu'un élément de réponse à la localisation de la RNAse D est apporté par le travail réalisé sur les cellules HeLa et décrit article 3 (Rech et al., 1979). Les hnRNP, c'est-à-dire le hnRNA nouvellement synthétisé et les protéines qui leur sont associées, sont utilisées comme source présumée de RNAse D, dans les conditions habituelles de l'essai enzymatique et avec le $|^3H|$ poly r(AU) comme substrat. Telle qu'elle vient d'être décrite l'expérience montre qu'aucune dégradation acido-soluble du substrat radioactif ne s'opère. Par contre, si les hnRNP sont passées sur une colonne de DEAE-cellulose et que l'expérience est refaite en utilisant l'effluent de la colonne comme source d'enzyme, nous constatons la dégradation acido-soluble du $|^3H|$ poly r(AU). Un résultat identique peut être obtenu si on traite les hnRNP par un mélange de RNAses A et T1. Ces quelques expé-

riences tendraient à prouver qu'une RNAse D se trouve dans les hnRNP, donc associée au hnRNA et de ce fait au lieu même où on espère la voir agir dans le compartiement nucléaire. L'absence d'activité dans les hnRNP natives ne peut nous étonner puisque c'est un phénomène constant avant purification. Il est possible que le RNA de la particule (retenu sur DEAE-cellulose ou dégradé par les RNAses) ait été compétiteur du poly r(AU), mais il est aussi possible que la particule ayant été complétement désorganisée par les traitements, l'enzyme ait pu venir au contact du substrat exogène radioactif. Ce système qui mérite plus ample expérimentation est digne d'intérêt car il constitue une source de RNAse D relativement purifiée et surtout rapide à obtenir. Le voisinage de l'enzyme avec son substrat supposé est sûrement un élément positif quoique l'expérimentation soit quasi impossible pour les raisons déjà mentionnées, à savoir l'hétérogénéité en nature et en taille de ces RNA. Cependant il est possible que la technique de fixation du BET puisse fournir de précieux renseignements.

R E S U M E

Par chromatographies successives sur phosphocellulose et DEAE-cellulose, nous purifions à partir des cellules d'ascites Krebs II, une RNAse D qui justifie ce nom par le fait qu'elle dégrade plus rapidement le RNA double chaîne que simple chaîne. In vitro, la réaction d'hydrolyse est partiellement inhibée en absence de magnésium et va en décroissant à mesure que la force ionique atteint et dépasse 0.15 M. Le RNA simple chaîne et double chaîne, le DNA, les polyanions comme l'héparine sont des compétiteurs de la réaction d'hydrolyse. L'enzyme est probablement constituée d'au moins deux sous-unités dont le PM serait compris entre 20 et 25 000. Bien que le mode d'action de l'enzyme ne soit pas connu, il semble qu'elle produise des coupures intra-chaînes 5'P et 3'OH mais la longueur minimale des fragments résultants n'a pu être évaluée. A partir du RNA préribosomal 45S, l'enzyme libère des produits de taille 28S et légèrement supérieurs à 18S. Sur les hnRNP de cellule HeLa, l'enzyme clive le hnRNA en une famille de produits dont la taille est comprise entre 23 et 18S. Par ailleurs, sur ces mêmes particules la RNAse D modifie les paramètres physico-chimiques de fixation du BET. Ceci peut être interprété comme étant soit le relâchement d'une contrainte exercée sur le RNA, soit l'élimination partielle d'une des deux familles de sites d'affinité différente pour le BET que montre la particule native. De ce qui précède, il ressort que la préparation d'enzyme est capable de servir pour les études de maturation et l'hypothèse selon laquelle la RNAse D participerait au "processing" du RNA reste très plausible.

B I B L I O G R A P H I E

ALBERTSON, P.A. (1960) dans Partition of Cells particles and Macromolecules, Wiley and Sons, Inc.

ALONI, Y., DHAR, R., LAUB, O., HOROWITZ, M. et KHOURY, G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 3686-3690.

BABINET, C. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 639-644.

BARTHOLEYNS, J., PEETER-JORIS, C., REYCHLER, H. et BAUDHUIN, P. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 205-211.

BERGET, S.M., MOORE, C., SHARP, P.A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 3171.

BERKOVER, I., LEIS, J. et HURWITZ, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5914-5921.

BILLETER, M.A., WEISSMANN, C. et WARNER, R.C. (1966) J. Mol. Biol. 17, 145-173.

BILLETER, M.A. et WEISSMANN, C. (1966) dans Procedures in Nucleic Acid Research, eds CANTONI, G. & DAVIES, D. (Harper and Row, New York) vol. 1, pp 498-519.

BISHAYEE, S. et MAITRA, U. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 306-313.

BLACKBURN, P., WILSON, G. et MOORE, S. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5904-5910.

BLANCHARD, J.M., BRUNEL, C. et JEANTEUR, Ph. (1977) Eur. J. Biochem. 79, 117-131.

BLANCHARD, J.M., WEBER, J., JELINEK, W. et DARNELL, J.E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5344-5348.

BRISSAC, C., RUCHETON, M., BRUNEL, C. et JEANTEUR, Ph. (1976) FEBS Lett. 65, 38-41.

BURGESS, R.R. et TRAVERS, A.A. (1971) dans Methods in Enzymology, eds COLOWICK, S.P. et KAPLAN, N.O. (Academic Press) vol. XXI, part D, pp 501-506.

CALVET, J.P. et PEDERSON, T. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 3705-3709.

CROUCH, R.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1314-1316.

CATHALA, G., RECH., J., HUET, J. et JEANTEUR, Ph. (1979) J. Biol. Chem. sous presse.

DARLIX, J.L. (1975) Eur. J. Biochem. 51, 369-376.

DARNELL, J.E. (1975) Harvey Lect. 69, 1-48.

DE WACHTER, R. et FIERS, W. (1972) Anal. Biochem. 49, 184-197.

DEZELEE, S., SENTENAC, A. et FROMAGEOT, P. (1974-a) J. Biol. Chem. 249, 5971-5977.

DEZELEE, S., SENTENAC, A. et FROMAGEOT, P. (1974-b) J. Biol. Chem. 249, 5978-5983.

DUCAMP, C. et JEANTEUR, Ph. (1973) Biochimie, 55, 1235-1243.

DUNN, J.J. et STUDIER, F.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 1559-1563.

DUNN, J.J. et STUDIER, F.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3296-3300.

DUNN, J.J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3807-3814.

DUNN, J.J., ANDERSON, C.W., ATKINS, J.F., BARTELT, D.C. et CROCKETT, W.C. (1976) dans Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, eds COHN, W.E. et VOLKIN, E. (Academic Press) vol. 19, pp 263-273.

FRANKLIN, R.M. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 1504-1511.

GEGENHEIMER, P., WATSON, N. et APIRION, D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3064-3073.

GOTOH, S., NIKOLAEV, N., BATTANER, E., BIRGE, C.H. et SCHLESSINGER, D. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 972-978.

GRUMMT, I., HALL, S.H. et CROUCH, R.J. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 437-443.

HAGEN, F.S. et YOUNG, E.T. (1978) J. of Virology 26, 783-792.

HALL, S.H. et CROUCH, R.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4092-4097.

HEWLETT, M.J., ROZENBLATT, S., AMBROS, V. et BALTIMORE, D. (1977) Biochemistry 16, 2763-2767.

HUET, J., SENTENAC, A. et FROMAGEOT, P. (1978) FEBS Lett. 94, 28-32.

JACOBSON, A., FIRTEL, R. et LODISH, H.F. (1974) dans Brookhaven Symp. Biol. 26, pp 307-319.

JEANTEUR, Ph., AMALDI, F. et ATTARDI, G. (1968) J. Mol. Biol. 33, 757-775.

JEANTEUR, Ph. et ATTARDI, G. (1969) J. Mol. Biol. 45, 305-324.

JELINEK, W. et DARNELL, J.E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2537-2541.

KINDLER, P., KEIL, T.U. et HOFSCHNEIDER, P.H. (1973) Molec. Gen. Genet. 126, 53-69.

KRAMER, R.A., ROSENBERG, M. et STEITZ, J.A. (1974) J. Mol. Biol. 89, 767-776.

LASKOVSKI, S.R. (1967) dans Procedures in Nucleic Acid Research, eds CANTONI, G. et DAVIES, D. (Harper and Row. New York) vol. 1, pp 154-187.

LAURENT, T.C. et KILLANDER, J. (1964) J. Chromatog. 14, 317-330.

LAZARUS, H.M. et SPORN, M.B. (1967) Proc. Acad. Sci. 57, 1386-1393.

LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M. et BOEDTKER, H. (1977) Biochemistry 16, 4743-4751.

LE PECQ, J.B. et PAOLETTI, C. (1967) J. Mol. Biol. 27, 87-106.

LE PECQ, J.B. et FESTY, B. (1975) Biochim. Biophys. Acta, 407, 40-42.

LEVINTOW, L. et DARNELL, J.E. (1960) J. Biol. Chem. 235, 70-73.

LINN, S. et LEHMAN, I.R. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1287-1293.

LOZERON, H.A., ANEVSKI, P.J. et APIRION, D. (1977) J. Mol. Biol. 109, 359-365.

MAIZEL, J.V. (1971) Method Virol. 5, 179-246.

MANDELL, J.D. et HERSHEY, A.D. (1960) Anal. Biochem. 1, 66-67.

MARCH, S.C., PARIKH, I. et CUATRECASAS, P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149-152.

MATHEWS, M.B. et KORNER, A. (1970) Eur. J. Biochem. 17, 328-338.

MATRINGE, H. et JACOB, M. (1972) Biochimie 54, 1169-1178.

Mc CLAIN, W.H. (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm. 86, 718-724.

MIRENBAUM, M., SCHLESSINGER, D. et HASHIMOTO, S. (1978) Biochemistry 17, 298-306.

MONTAGNIER, L. (1968) C.R.H. Acad. Sci. Paris, D 267, 1417-1420.

NAORA, H. et WHITELAM, J.M. (1975) Nature 256, 756-759.

NIKOLAEV, N., SILENGO, L. et SCHLESSINGER, D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7967-7969.

OHTSUKI, K., GRONER, Y. et HURWITZ, J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 483-491.

OKAMOTO, T. et KAWADE, Y. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 324-328.

PAOLETTI, J. (1971) Thèse Doctorat d'Etat, Paris.

PEACOCK, A.C. et DINGMAN, C.W. (1967) Biochemistry, 6, 1818-1827.

RECH, J., CATHALA, G. et JEANTEUR, Ph. (1976) Nuc. Acids. Res. 3, 2055-2065.

RECH, J., BRUNEL, C. et JEANTEUR, Ph. (1979) Biochim. Biophys. Res. Commun 88, 422-427.

ROBERTSON, H.D., WEBSTER, R.E. et ZINDER, N.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 82-91.

ROBERTSON, H.D. et MATHEWS, M. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 225-229.

ROBERTSON, H.D. et DICKSON, E. (1974) dans Brookhaven Symp. Biol. 26, pp 240-266.

ROBERTSON, H.D. et DUNN, J.J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3050-3056.

ROBERTSON, H.D., DICKSON, E. et JELINEK, W. (1977) J. Mol. Biol. 115, 571-589.

ROBERTSON, H.D. (1977) dans Nucleic Acid-Protein Recognition, ed. VOGEL, B. (Academic Press) pp 549-568.

ROBERTSON, H.D. et BARANY, F. (1978) Proceedings of the 12 th FEBS Congress (Pergamon Press) sous presse.

ROSENBERG, M., KRAMER, R.A. et STEITZ, J.A. (1974) J. Mol. Biol. 89, 777-782.

ROTH, J.S. (1967) Methods Cancer Res. 3, 151-243.

RYSKOV, A.P., TOTARSKAYA, O.V., GEORGIEV, G.P., COUTELLE, C. et THIELE, B. (1976) Nucl. Acids. Res. 3, 1487-1498.

RYSKOV, A.P., KRAMEROV, D.A. et GEORGIEV, G.P. (1976) Biochim. Biophys. Acta 447, 214-229.

SAHA, B.K. et SCHLESSINGER, D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4537-4543.

SCATCHARD, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-675.

SCHERRER, K. et DARNELL, J.E. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 486.

SCHWEITZ, H. et EBEL, J.P. (1971) Biochimie 53, 585-593.

SEMANCIK, J.S., VIDAVER, A.K. et VAN ETTEN, J.L. (1973) J. Mol. Biol. 78, 617-625.

SHANMUGAN, G. (1978) Biochemistry, 17, 5052-5057.

TENER, G.M. (1967) dans Methods in Enzymology, eds COLOWICK, S.P. et KAPLAN, N.O. (Academic Press) vol. 12, part A, pp 398-404.

THOMPSON, S.T., CASS, K.H. et STELLWAGEN, E. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 669-672.

TORELLI, U.L., FERRARI, S.T., TORELLI, G.M., CADOSSI, R., FERRARI, S.E., MONTAGNANI, S. et MARNI, F. (1977) Molec. Biol. Rep. 3, 403-411.

VAN ETTEN, J.L., VIDAVER, A.K., KOSKI, R.K. et BURNETT, J.P. (1974) J. of Virology, 13, 1254-1262.

VIDAVER, A.K., KOSKI, R.K. et VAN ETTEN, J.L. (1973) J. of Virology, 11, 799-805.

VINOGRAD, J., LEBOWITZ, J. et WATSON, R. (1968) J. Mol. Biol. 33, 173-197.

WAGNER, A.F., BUGIANESI, R.L. et SHEN, T.Y. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 184-189.

WELLAUER, P.K. et DAVID, I.B. (1974) dans Brookhaven Symp. Biol. 26, 214-223.

WILCHEK,M. et GORECKI, M. (1969) Eur. J. Biochem. 11, 491-494.

WILSON, J.E. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 816-823.

WINICOV, I. et PERRY, R.P. (1974) Biochemistry 13, 2908-2914.

WINICOV, I. et PERRY, R.P. (1974) dans Brookhaven Symp. Biol. 26, 201-213.

ZIMMERMAN, S. et SANDEEN, G. (1965) Anal. Biochem. 10, 444-449.

ARTICLE 1

Volume 3 no.8 August 1976 Nucleic Acids Research

Partial purification of a double-stranded RNA specific ribonuclease (RNAse D) from Krebs II ascites cells.

J. Rech, G. Cathala and Ph. Jeanteur

Lab. Biol. Mol., Univ. Sci. et Tech. du Languedoc, 34060 Montpellier Cedex and Lab. Biochim., Cent. Paul Lamarque, Hôp. St-Eloi, 34059 Montpellier Cedex, France.

Received 7 June 1976.

ABSTRACT

In a search for eucaryotic enzymes which might process the heterogenous nuclear RNA (HnRNA) from animal cells into messenger RNA, a ribonuclease called RNAse D analogous to E. coli RNAse III in its ability to cleave specifically synthetic or viral double-stranded polyribonucleotides has been detected and extensively purified from the cytosol of Krebs II mouse ascites cells. The purification procedure involved cellular fractionation followed by DEAE and CM-cellulose chromatography and resulted in an RNAse D preparation contaminated with trace amounts of single-strand specific RNAse (equivalent to less than 0.3 ng per ml) as assayed against poly(rC). Significant levels of RNAse H activity against poly(rA) - poly(dT) were still present in these preparations.

INTRODUCTION

It has been well established for some years that rRNA of eucaryotic cells is synthesized as a large 45S precursor which is then processed into mature 28S and 18S RNA by a non-conservative mechanism which results in the overall loss of about 50% of the initial sequences[1,2]. Similarly, it seems likely that the heterogeneous nuclear RNA (HnRNA) serves as a precursor to the polysomal mRNA[3-5]. We have therefore been interested in looking for enzymes which might process the HnRNA into mRNA.

A plausible candidate for playing a part in such a function might be an enzyme analogous to RNAse III from E. coli (EC. 3.1.4.24) which is specific for double-stranded RNA[6]. This enzyme has been identified as the "sizing factor" which cuts the giant mRNA transcribed in vitro from T7 DNA by E. coli RNA-polymerase to the right size.[7] Mutants of E. coli which are deficient in RNAse III have been isolated. When infected by T7 phage, such mutants are unable to process this giant mRNA precursor[7] whereas uninfected cells accumulate a new RNA species which contains the sequences of both 16S and 23S rRNA[7,8].

The present paper reports on the occurrence and purification of an RNAse

© Information Retrieval Limited 1 Falconberg Court London W1V 5FG England

from Krebs II ascites cells cytosol which cleaves the poly(rC) strand of a poly(rC) - poly(rG) duplex as well as double-stranded Qβ phage RNA. Following the proposal of Robertson[9], the generic name RNAse D will be used to designate this enzyme so as to emphasize its specificity towards double-stranded RNA.

MATERIALS AND METHODS

Materials

CM-cellulose (CM 52) and DEAE-cellulose (DE 52) were purchased from Whatman. Ribonuclease A was from Worthington. All non-radioactive polynucleotides were obtained from Boehringer. (^{14}C) poly(rC) (3.3×10^4 cpm/µg) and (^{14}C) poly(rA) (1.6×10^4 cpm/µg) synthesized by Sepharose-bound E. coli polynucleotide phosphorylase were kindly provided by Dr. M. Thang. (^{14}C) poly(rC) - poly(rG) was prepared by annealing equimolar amounts of both polynucleotides for 1 hour at 70°C in 1 M NaCl, followed by slow cooling. Such annealing conditions are likely to minimize production of triple-stranded helices[10]. In order to reduce the amount of (^{14}C) poly(rC) which might still remain single-stranded, a 25% excess of unlabeled poly(rG) was added and reheated at 70°C for 5 min. Qβ double-stranded RNA was synthesized in vitro with Qβ replicase using (α^{32}P)-ATP as a substrate and was kindly provided by Dr. E. Domingo. At the time of the experiments, the synthetic minus strand had a specific radioactivity of about 29,000 cpm/µg. (^{14}C) poly(rA) - poly(dT) was obtained in the same way as (^{14}C) poly(rC) - poly(rG) except for the annealing temperature which was 37°C.

Growth of ascites cells

Krebs II ascites cells were obtained from Dr. B. Lebleu. They were maintained by serial intraperitoneal injection of 0.25 ml ascitic fluid at 6-8 days intervals into swiss mice (IFFA-CREDO, France). Collection and washing of cells were as already described[11]. Tumors with too much blood were discarded.

Assays

Standard reaction mixtures for RNAse D assay contained in a final volume of 0.1 ml : 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NH_4Cl, 10 mM Mg acetate, 600 cpm of (^{14}C) poly(rC) - poly(rG) and up to 20 µl of enzyme. After incubation for 2 hours at 37°C, the reaction was stopped by 3 ml of cold 5% trichloracetic acid and 100 µg of carrier bovine serum albumin. After 10 minutes in ice, precipitates were collected on glass filters (Whatman GF/A), washed with

cold 5% trichloracetic acid and ethanol, dried and counted in a SL30 Intertechnique scintillation counter using a toluene based scintillation fluid. Activity was expressed as the percent loss of initial acid-precipitable counts. Similarly, assays with double-stranded Qβ RNA as a substrate contained 600 cpm corresponding to 2×10^{-2} µg of minus strand.

RNAse H (Hybridase, EC 3.1.4.34) was assayed using (^{14}C) poly(rA) - poly(dT) under identical conditions except that incubation was at 20°C.

RNAse activity against polyribonucleotides was assayed according to Zimmermann and Sandeen[12] except for poly (rU) which was precipitated with 70% ethanol in 0.1 M NaCl. Published procedures were used to assay for DNAse[13], phosphodiesterase[14] and nucleotidase[14] whereas phosphomonoesterase was tested with p-nitrophenylphosphate as substrate at pH 5 (acetate buffer), 7.2 (Tris-HCl buffer) and 9.6 (carbonate buffer). Protein concentration were determined after trichloracetic acid precipitation according to Linn and Lehman[15].

RESULTS AND DISCUSSION

A typical purification experiment will be presented below. All operations have been carried out at 4°C, unless otherwise stated.

Cellular fractionation and RNAse D localization

7 ml of packed Krebs ascites cells grown, collected and washed as described in Materials and Methods, are resuspended in 14 ml of hypotonic medium (10 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 10 mM KCl ; 1.5 mM Mg acetate). After swelling in ice for 5-10 minutes, about 70% of the cells are broken, as judged by phase contrast microscopy, by 15-25 strokes in an all-glass Dounce homogenizer equipped with a loosely fitting pestle. Isotonicity is restored by adding 2.3 ml of concentrated buffer (0.3 M Tris-HCL pH 7.5 ; 1.25 M KCl ; 50 mM Mg acetate ; 60 mM β-mercaptoethanol) to the homogenate which is then centrifuged at 16,000 rpm for 10 minutes in the rotor 59584 of the HS 25 MSE centrifuge. The clear liquid supernatant (S-30) (Fraction I) between the pellet and the fluffy lipid layer floating on top is collected (14.5 ml) and deposited in three tubes on top of two 1 ml cushions of 1.8 M and 1 M sucrose in Buffer A (30 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 0.125 M KCl ; 5 mM Mg acetate ; 6 mM β-mercaptoethanol). After centrifugation for 90 minutes at 55,000 rpm in the Spinco rotor, the supernatants over the sucrose cushions are collected and pooled to yield 10 ml of S-150 fraction (Fraction II).

This homogenization procedure, which is essentially that described by Mathews and Korner[11] has been the only one which has enabled us to detect the

enzyme in crude cytoplasmic extracts. Using the fractionation procedure described above, the two following observations show that most of the apparent activity against poly(rC)-poly(rG) resides in the S-150 fraction. Firstly, when cells were more extensively broken in the same ionic conditions as above, so as to obtain nuclei as free as possible of cytoplasmic contamination, the activity in sonicated nuclei was much lower than in the cytoplasm, although still detectable. Secondly, no activity has been found in

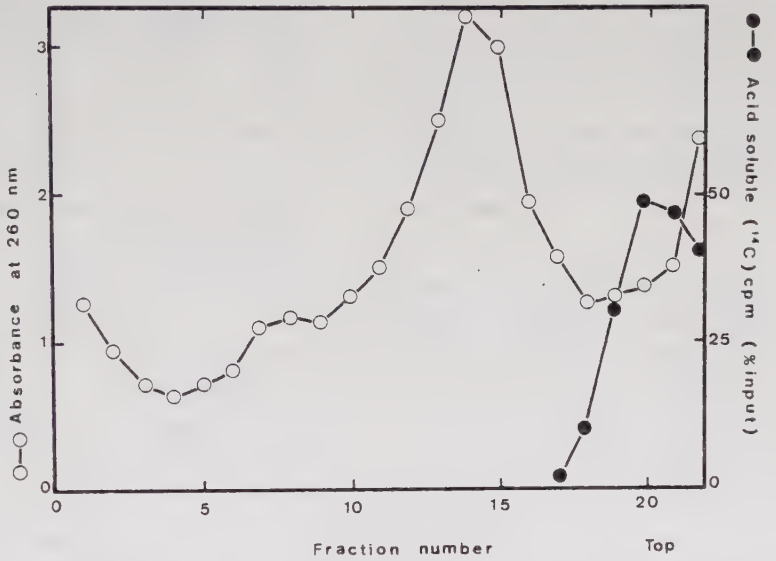


Figure 1 : Distribution of cytoplasmic RNAse D in a sucrose gradient. A fraction of the cell homogenate brought back to isotonicity (see Materials and Methods) was centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes. A 0.5 ml aliquot of the resulting supernatant was layered on top of an 11 ml 10-30% (w/v) sucrose gradient in 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.6 containing 100 mM KCl, 40 mM NaCl and 5 mM Mg acetate (16). After centrifugation for 90 minutes at 37,000 rpm in the Spinco SW 41 rotor, fractions were collected and assayed for absorbance at 260 nm (o——o) and RNAse D under standard conditions (• —— •).

association with ribosomes on sucrose gradient either in hypo-or isotonic conditions. A typical experiment performed under the latter conditions is presented in Fig. 1. Along the same line, no activity could be detected in the 150.000 g pellet containing the ribosomes even after attempts to solubilize the enzyme with up to 0.8 M KCl. This observation is contradictory to a previous report[17] who found a similar activity partly associated with pelleted ribosomes.

Ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-25 chromatography

To 10 ml of fraction II (S-150) are added 15 ml of a saturated,

neutralized ammonium sulfate solution so as to give 60% saturation. After gentle stirring for 2 hours, the precipitate is collected by a 20 minutes spin at 20,000 rpm, then redissolved in 2 ml buffer A containing 10% glycerol. The resulting fraction is then applied to a Sephadex G-25 column (2 x 30 cm) equilibrated and developed with the same buffer. The enzyme activity is found in the excluded volume and the corresponding fractions are pooled (fraction III).

DEAE-cellulose chromatography

The above fraction is diluted by an equal volume of buffer A lacking KCl so as to reduce its concentration to 0.062 M and applied to a 1.7 x 10 cm DEAE-cellulose column equilibrated with the same buffer. The enzyme does not bind to this column (not shown) and is recovered in the flow-through fractions which are pooled (fraction IV).

CM-cellulose chromatography

The above fraction (55 ml) is brought to 70% saturation by adding solid ammonium sulfate (26 g). After overnight precipitation under magnetic stirring, the precipitate is collected by centrifugation as described above, redissolved in 4 ml buffer B (20 mM Tris-HCl 7.2 ; 10 mM KCl ; 5 mM Mg acetate ; 6 mM β-mercaptoethanol ; 10% glycerol) and dialysed against three 100 ml changes of this buffer for a total of 5 hours. The resulting sample is loaded onto a 1.6 x 8 cm CM-cellulose column equilibrated with buffer B. After overnight washing with the same buffer, elution is carried out by a 10 - 250 mM KCl linear gradient in buffer B. The chromatographic profile presented in figure 2 shows that the activity elutes as a broad peak between 0.06 M and 0.11 M KCl. Fractions containing activity were pooled, precipitated as above with 70% ammonium sulfate then redissolved in and dialysed against buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 10 mM KCl ; 5 mM Mg acetate ; 6 mM β-mercaptoethanol ; 10% glycerol) to yield 5 ml of fraction V.

Second cycle of DEAE-cellulose chromatography

A this stage of purification our RNAse D preparation still contained high levels of hybridase activity but was already devoid of hydrolytic activity against any of the four homopolyribonucleotides when assayed under the standard conditions (20 min incubation) of Zimmermann and Sandeen[12]. Further purification steps involving hydroxyapatite and phosphocellulose chromatography have therefore been attempted. Although RNAse D did apparently bind to both columns as it was not detectable in the flow-through, we were unable to elute it. In view of this failure, we have performed a second cycle of DEAE-cellulose chromatography a procedure which had proved sucessful in

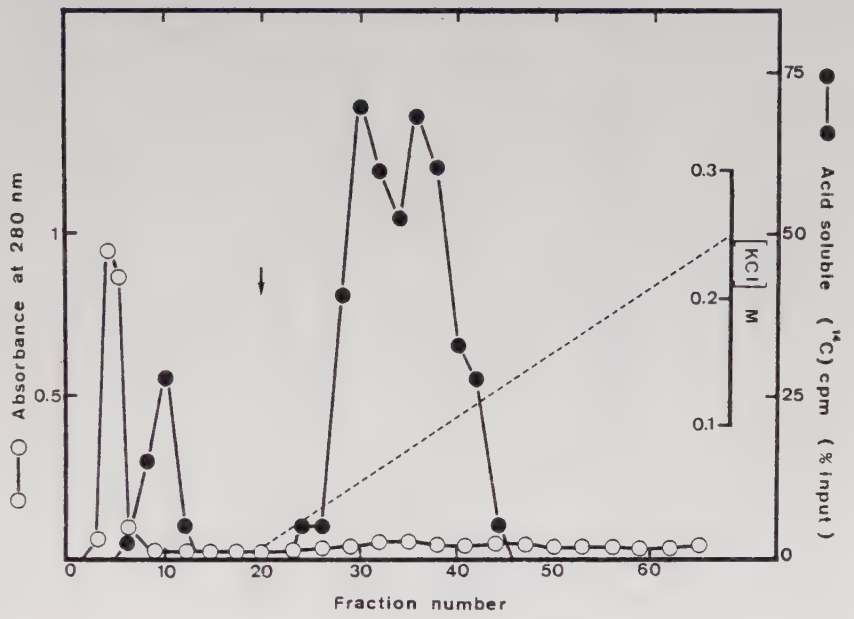


Figure 2 : Chromatography on CM-cellulose.
Fraction IV was precipitated with 70% ammonium sulfate, dialysed against buffer B and loaded on a 1.6 x 8 cm CM-cellulose column equilibrated with the same buffer. After overnight washing, elution was carried out by a 200 ml 10-250 mM KCl linear gradient in buffer B at a flow rate of 15 ml/hr. 4 ml fractions were collected and assayed for absorbance at 280 nm (o—— o) and RNAse D under standard conditions (•——— •).
Beginning of elution is indicated by an arrow in the diagram.

removing traces of non-specific ribonuclease from E. coli RNAse III[18].

The relatively high KCl molarity (0.062 M) used for loading our first DEAE column was imposed on us by the prior Sephadex G-25 column. At this stage, it was possible to use a lower KCl concentration (10 mM). Fraction V was therefore loaded on a DEAE-cellulose column (1.5 x 6 cm) equilibrated with buffer C. Under these conditions, RNAse D still does not bind to the column (not shown). The flow-through fractions containing the enzyme were pooled (fraction VI).

Chromatographic behaviour on Sephadex G-200

Gel filtration on Sephadex G-200 has been attempted as means of purification at several stages of the above protocol. When an aliquot of Fraction II precipitated with ammonium sulfate (60%) is applied to a G-200 column in buffer A, RNAse D activity is eluted with the void volume as shown in figure 3A, while RNAse H is not detectable in this fraction and is eluted later. It would therefore seem to be a useful purification step in removing

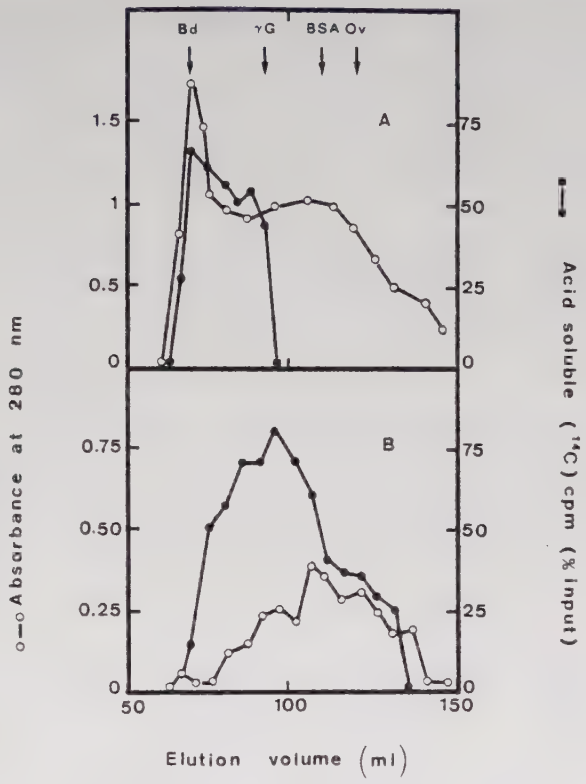


Figure 3 : Pattern of RNAse D activity on Sephadex G-200 at two stages of purification.

A 1.5 x 90 cm column equilibrated with buffer B and developed at 10 ml/hr was used in both cases. 2.5 ml fractions were collected and assayed for absorbance at 280 nm (o——o) and RNAse D under standard conditions (•——•). Elution volumes of the Blue Dextran (Bd), human γ globulin (γG), bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (Ov) markers are indicated by arrows.

A) An aliquot of Fraction II was precipitated by 60% ammonium sulfate, dissolved in 2 ml buffer B (about 40 mg protein) and applied to the column.

B) An aliquot of Fraction IV was precipitated and dissolved as above in 2 ml buffer B (about 15 mg protein) before being applied to the column.

contaminating RNAse H. However, at this early stage of purification, the large amount of material to be processed requires an important scaling up of the column which we have so far failed to run successfully. Exclusion of RNAse D from the gel seems indicative of some kind of aggregation. Indeed, when an aliquot of fraction IV is run on the same column (figure 3B), RNAse D is no longer excluded and elutes as a broad peak centered close to the

γ globulin marker (about 150,000 daltons) with a shoulder slightly ahead of ovalbumin (about 50,000 daltons). Similar results were obtained regardless of the maximum level of degradation observed in peak fractions. When fraction VI was run on this column, all the activity has been lost. From the present data, it is therefore not possible to give any satisfactory estimate of the molecular weight.

Results of purification and enzymatic properties of purified fractions

A summary of the purification is presented in Table 1. Initial levels of activity are always low and unreproducible until after the first DEAE cellulose column (fraction IV), at which stage they are dramatically increased (about 4 fold in this case).

In this situation, which is strongly suggestive of the presence of an endogenous inhibitor being removed at this stage of purification, activity measurements in fraction I to III (numbers in parentheses) cannot be taken as reliable estimates of the actual level of enzyme present in these fractions.

Table 1 : Purification of RNAse D

Fraction	Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
I	S-30	362	(30)	(0.08)
II	S-150	140	(33)	(0.23)
III	Sephadex G-25	84	(33)	(0.39)
IV	DEAE-Cellulose	25	136	5.4
V	CM-Cellulose	1.6	66	41
VI	Second-DEAE-Cellulose	0.21	11	52

One unit of RNAse D activity is defined as that amount of enzyme which results in the loss of 1 nmole of TCA precipitable radioactivity from (^{14}C) poly(rC)-poly(rG) per hour under the conditions described in Materials and Methods. The specific activity is the number of units per mg of protein.

At later stages of purification (fractions IV to VI), the validity of activity determinations was supported by a linear relationship between rate of hydrolysis and enzyme concentration. Although a true overall purification factor cannot be derived from the data of Table 1, due to the above

difficulties, a 650-fold increase in specific activity together with a 1,700 fold reduction in total protein, definitely show that a good purification of RNAse D has indeed been achieved. Conversely, the levels of single-strand specific RNAses have been dramatically reduced during this procedure. Indeed, while fraction I readily degraded all four polyribonucleotides under the standard assay of Zimmermann and Sandeen[12], fractions V and VI showed no detectable activity under the same conditions (20 min incubation). Assuming that 10 pg RNAse A would be detected in this assay[12] we conclude that fractions V and VI already contained less than 330 pg of RNAse A equivalent per ml. However, complete elimination of contaminating non-specific RNAses is of cardinal importance, should this enzyme be used in studies on the processing of high molecular weight RNA. We therefore increased the incubation time of the assay for as long as 5 hrs in order to get a detectable level of hydrolysis with either fractions V or VI. It thus seems that the actual level of contamination is probably well below 330 pg of RNAse A equivalent per ml of purified RNAse D (fractions V or VI).

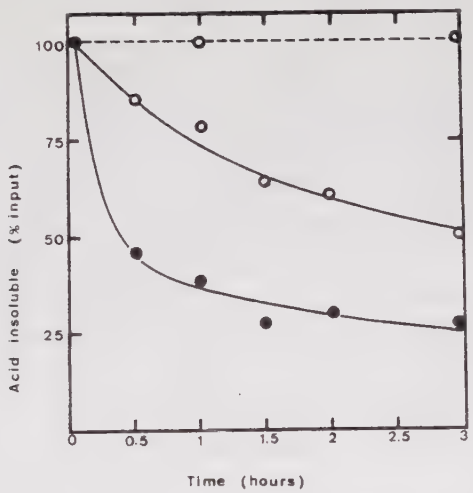


Figure 4 : Comparative digestion of double-stranded RNAs by purified RNAse D and RNAse A.

Each point corresponds to an individual standard reaction mixture incubated for different periods of time with either 3 µg Fraction V or 0.1 µg RNAse A, except for the time zero assay which contained no enzyme.
• —— • Hydrolysis of (^{14}C) poly(rC) - poly(rG) (600 cpm) by RNAse D
o —— o Hydrolysis of (^{32}P) double-stranded Qβ RNA (600 cpm) by RNAse D
o ---- o Hydrolysis of (^{32}P) double-stranded Qβ RNA (600 cpm) by RNAse A.

Significant levels of hybridase activity against (^{14}C) poly(rA)-poly(dT) was constantly found associated with RNAse D, although the total amount

present in fraction VI was less than 2% of the initial value. This observation would seem to favor the idea that these two enzymes are distinct entities as is the case in E. coli[19]. The following contaminating activities failed to be detected in fraction VI : DNAse activity on either native or denatured calf thymus DNA at both pH 5 and pH 8, 5'-nucleotidase, phosphodiesterase and phosphomonoesterase at alkaline and neutral pH . Some of the latter activity could be observed at acidic pH.

Specificity of this enzyme towards double-stranded RNA is clearly established by the data presented in Fig. 4. Indeed, they show that under conditions where poly(^{14}C) poly(rC) - poly(rG) is hydrolyzed by RNAse A to not more than 20% (not shown) it is solubilized to 80% by our enzyme preparation. It is confirmed by its ability to render acid-soluble about 50% of the (^{32}P) labeled minus strand of Qβ double-stranded RNA synthesized in vitro by Qβ replicase under conditions where 1 µg/ml pancreatic ribonuclease has no detectable effect. Hydrolysis of this substrate was inhibited to 80% by 50 mM EDTA.

CONCLUSION

In a search for enzymes which might possibly process the HnRNA into mRNA, we have detected and purified 650 fold a ribonuclease which, like E. coli RNAse III, is able to degrade synthetic poly(rC) - poly(rG) or double-stranded Qβ RNA. The rationale underlying this approach is that RNAse III is indeed able to process the early T7 primary transcript as well as E. coli precursor rRNA[7,8]. The E. coli enzyme is also able to introduce a discrete set of breaks into several eucaryotic RNAs : 45S rRNA precursor[18] and HnRNA from HeLa cells[9], adenovirus messenger, 28S and 18S rRNA from KB cells[20].

So far, there have been only suggestions as to the possible existence of such an enzyme in eucaryotic cells. Robertson and Mathews[17] detected in an S-30 extract from Krebs cells a nuclease showing a preference for double-stranded RNA and which appeared to be at least in part associated with ribosomes at variance with our results of Fig. 1. Ribonucleases able to solubilize double-stranded RNA have been detected in membrane fractions of different tissues[21] and KB cells[22] where they can only be detected after detergent treatment. Such a treatment is completely inhibitory to our RNAse D which therefore appears to be unrelated to the above activities. As to the activity detected by Birge and Schlesinger in HeLa cells nuclei[23], its completely different localization makes it difficult to be compared to ours.

The significant purification reported here and the concomitant reduction

of single-strand specific RNAse activity to hardly detectable levels clearly establishes that the present enzyme is a distinct ribonuclease with all the attributes of an RNAse D. It is currently being tested for processing activity in various model systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. M.N. Thang for his help in preparing (^{14}C) polyribonucleotides and to Dr. E. Domingo for providing us with synthetic Qβ double-stranded RNA. Thanks are also due to Mrs. A. Vié for expert technical assistance and to Miss P. Laur for her help in typing the manuscript.

This work was supported by grants from CNRS, INSERM, DGRST, the Ligue Nationale Contre le Cancer and the Fondation pour la Recherche Medicale Française.

REFERENCES

(1) Jeanteur, Ph., Amaldi, F. and Attardi, G. (1968) J. Miol. Biol. 33, 757-775
(2) Jeanteur, Ph. and Attardi, G. (1969) J. Miol. Biol. 45, 305-324
(3) Darnell, J.E., Jelinek, W.R. and Molloy, G.R. (1973) Science 181, 1215-1221
(4) Ruiz-Carillo, A., Beato, M., Schurtz, G., Feigelson, P. and Allfrey, V.G. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3641-3645
(5) Spohr, G., Imaizumi, T. and Scherrer, K. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 5009-5013
(6) Robertson, H.D., Webster, R.E. and Zinder, N.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 82-91
(7) Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3296-3300
(8) Nikolaev, N., Silengo, L. and Schlessinger, D. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3361-3365
(9) Robertson, H.D. and Dickson, E. (1974) Brookhaven Symp. Biol. 26, 240-266
(10) Thiele, D. and Guschlbauer, W. (1971) Biopolymers 10, 143-157
(11) Mathews, M.B. and Korner, A. (1970) Eur. J. Biochem. 17, 328-338
(12) Zimmermann, S. and Sandeen, G. (1965) Anal. Biochem. 10, 444-449
(13) Bartholeyns, J., Peeters-Joris, C., Reychler, H. and Baudhuin, P. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 205-211
(14) Laskowski, S.R. (1967) in Procedures in Nucleic Acid Research, eds. Cantoni, G. and Davies, D. (Harper and Row, New-York) Vol. 1. pp. 154-187
(15) Linn, S. and Lehman, I.R. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1287-1293
(16) Hogan, B.L.M. and Korner, A. (1968) Biochim. Biophys. Acta 169, 129-138
(17) Robertson, H.D. and Mathews, M.B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 225-229
(18) Gotoh, S., Nikolaev, N., Battaner, E., Birge, C.H. and Schlessinger, D. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 972-978
(19) Crouch, R.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1314-1316
(20) Westphal, H. and Crouch, J.R. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3077-3081
(21) Stern, R. and Wilczek, J. (1973) Federation Proceedings 32, 2287
(22) Bothwell, A.L.M. and Altman, S. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1451-1459
(23) Birge, C.H. and Schlessinger, D. (1974) Federation Proceedings 33, 1275

ARTICLE 2

vol. 254 1979 (sous presse) The Journal of Biological Chemistry

Isolation and characterization of two types of ribonucleases H in Krebs II Ascites cells.

Guy CATHALA, Jocelyne RECH, Janine HUET[+] and Philippe JEANTEUR.

Laboratoire de Biologie Moléculaire, Univ. Sci. et Tech. du Languedoc, 34060 Montpellier cedex, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer, C.P.L Hôpital Saint Eloi, 34059 Montpellier Cedex and [+]Service de Biochimie, Départ. de Biol. Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, B.P. n°2, 91190 Gif sur Yvette, France.

ABSTRACT

Two types of RNAses H, which selectively degrade the RNA strand of an RNA-DNA hybrid and are inhibited by ethidium bromide, have been separated and partially purified from Krebs ascites cells by a combination of gel filtration and chromatographies on DEAE and phosphocellulose. Neither one of the two types of RNAse H had any detectable activity against double-stranded RNA.

These two activities were found to be quite different by their physico-chemical and enzymological properties. The first type, H_1, had a high apparent molecular weight on gel filtration of 105-110,000 ("maxi" enzyme) as opposed to the 36-40,000 value found for the second type, H_2 ("mini"enzyme). Although H_1 and H_2 both show an absolute requirement for a divalent cation which can be satisfied by Mg^{2+}, only H_1 can utilize Mn^{2+} with an even stronger preference. H_1 activity is maximum between 5-50 mM salt and quickly declines at higher values while H_2 does not work at low ionic strength and requires about 0.15-0.2 M KCl for optimum activity. Both types are also easily driscriminated by thiol reagents. H_2 is completely inactive in the absence of mercaptoethanol or in the presence of NEM while H_1 is insensitive to both reagents. H_1 is more susceptible to inhibition by nucleic acids than H_2. They have in common the property to act as endonuclease yielding a small percentage of 5'-mononucleotides and to be unexpectedly inhibited by dextran.

After electrophoresis on SDS-acrylamide gel containing the $\{^{32}P\}$ hybrid substrate, H_2 could be renatured into active form in situ after SDS removal and directly visualized by autoradiography as clear bands of degraded substrate. A major such band was observed at a position corresponding to a subunit molecular weight of 33,000 which exhibited the characteristic sensitivity of H_2 to N-ethylmaleimide found in the test tube. Under the same conditions, we failed to ever detect H_1. The purity and subunit structure of both enzymes are discussed in the light of the above data.

ARTICLE 3

Vol. 88, No. 2, 1979 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
May 28, 1979 Pages 422-427

HnRNP FROM HeLa CELLS CONTAIN A RIBONUCLEASE ACTIVE ON DOUBLE-STRANDED RNA

Jocelyne Rech, Claude Brunel and Philippe Jeanteur

Laboratoire de Biologie Moléculaire, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place E. Bataillon, 34060 Montpellier Cédex and Laboratoire de Biochimie, C.R.L.C. Paul Lamarque, B.P. 5054, 34033 Montpellier Cédex, France

Received March 7, 1979

SUMMARY

A ribonuclease D, i-e acting against double-stranded RNA structures like poly r(AU), was identified in ribonucleoprotein structures containing the heterogenous nuclear RNA (hnRNP) from HeLa cells. This activity could not however be detected in intact hnRNP but only after passage through a DEAE -cellulose column or digestion by a combination of ribonucleases A+T_1. This enzyme does not degrade poly r(A)-poly d(T) nor poly r(A), nor does it yield mononucleotides, excluding the possibility of a non-specific exonuclease type of activity like phosphodiesterase. It is inhibited by ethidium bromide and double-stranded RNA and resembles in all respects so far investigated the ribonuclease D previously isolated from Krebs cells by Rech et al (Nucl. Acids Res. 1976, 3, 2055-2065).

INTRODUCTION

Excision of extensive RNA sequences followed by religation through an accurate splicing mechanism is certainly the most drastic modification suffered by hnRNA when being processed into mRNA (1). We have been searching for the past few years for an enzyme which might act at the cleavage step of the splicing reaction. By analogy with *E. coli* RNAse III which exhibits in vitro specificity towards dsRNA (2) and has been unambiguously involved in the specific cleavage of primary transcripts of *E. coli* rRNA (3,4) as well as of T7 mRNA (3), we have chosen to look for a eucaryotic enzyme with a similar specificity. This working hypothesis was supported by the suggestion that dsRNA regions might be involved in the maturation of hnRNA into mRNA. Indeed such regions exist in hnRNA (5-16) and are not recovered from poly(A) containing cytoplasmic mRNA (9). Moreover, there is sequence complementarity between mRNA and hnRNA (17) whose ds regions can form duplexes with mRNA (18-20). This suggests that only one of the two strands of some ds regions is lost during processing and therefore that some important cleavage sites may occur within them.

0006-291X/79/100422-06$01.00/0

Copyright © 1979 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

We have previously been able to detect and partially purify such an RNAse D activity from Krebs ascites cells (21). Should this enzyme play a role in the processing of hnRNA, it would be of interest to find it associated with hnRNP, i-e with the ribonucleoprotein structure in which hnRNA is engaged during all of its nuclear residence (22,23).

The present report demonstrates the occurence in HeLa hnRNP of an enzyme activity able to degrade exogenous poly r(AU) and which therefore resembles the previously described RNAse D from Krebs cells (21). However, in native hnRNP this activity appears to be masked as far as the hydrolysis of poly r(AU) is concerned and its detection requires prior elimination of endogenous nucleic acids.

MATERIALS AND METHODS

hnRNP either cold or pulse-labeled for 30 minutes with $|^{3}H|$uridine in the presence of 0.04 µg/ml actinomycin D were prepared as described previously (24) using a slight modification of the procedure of Kish and Pederson (25). For all enzymatic experiments, hnRNP were adjusted to 0.13 M NaCl in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5 mM $MgCl_2$ (buffer A). For DEAE-cellulose chromatography, they were adjusted to 50 mM NaCl and 6 mM 2-mercaptoethanol in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5 mM $MgCl_2$ (buffer B).

Radioactive poly r(AU) was prepared using $|^{3}H|$ATP (Amersham) as a precursor and poly d(AT) (P.L. Biochemicals) as template under the reaction conditions described by Berkower et al. (26). After incorporation reached a plateau, the poly d(AT) strand was destroyed by digestion with 10 µg/ml DNAse I (Worthington DPFF, RNAse free). After sodium dodecyl sulfate-phenol extraction and ethanol precipitation, the radioactive poly r(AU) was separated from unincorporated precursors by gel filtration on Sephadex G-50 fine in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M KCl. $|^{14}C|$poly r(A) and $|^{14}C|$poly r(A)-poly d(T) were prepared as described previously (21).

The double-stranded RNA containing phage ϕ6 was grown on *Pseudomonas phaseolicola* according to Vidaver et al. (27). After sodium dodecyl sulfate-phenol-chloroform extraction, RNA was ehanol-precipitated, dissolved in buffer A and treated by 10 µg/ml DNAse I for 30 minutes at room temperature. After addition of 1/9th volume 10xSSC (0.15 M Na Citrate, 1.5 M NaCl) and further treatment with 10 µg/ml pancreatic RNAse A (Worthington RAF, boiled 5 minutes at 100°C) for 30 minutes at room temperature, it was reextracted with phenol and precipitated from ethanol by spooling around a glass rod.

RNAse D from Krebs ascites cells was prepared by a modification of the previously described procedure (21). RNAse T_1 was from Calbiochem.

Proteins were assayed either by absorbance at 280 nm or by Bradford's technique (28) using bovine serum albumin as a standard.

RESULTS AND DISCUSSION

When $|^{3}H|$poly r(AU) was incubated at 37°C in the presence of 30 micrograms of HeLa hnRNP, no significant hydrolysis was observed for incubation times up to 45 minutes (Figure 1). Varying the amount of hnRNP from 1.5 to 75 µg yielded the same results (not shown). We can therefore conclude that no RNAse D can be detected on exogenous substrate in hnRNP under these conditions. However, previous experience with Krebs RNAse D (21) taught us that the activity was

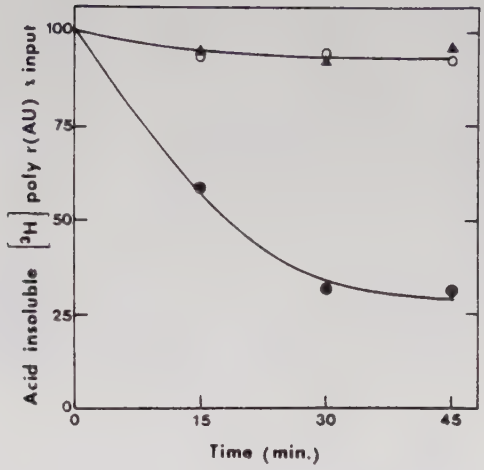


Fig. 1 :
Degradation of $|^3H|$poly r(AU) by hnRNP exposed to RNAses A+T_1. 20 microliter aliquots of hnRNP containing 30 micrograms of protein were incubated either alone (○) or in the presence of RNAses A (10 µg/ml) and T_1 (50 units/ml) (●) for one hour at 37°C. 80 microliters of standard RNAse D assay buffer (21) containing 4,000 cpm $|^3H|$poly r(AU) were added to each tube and incubation was continued for indicated times. At the end of the selected incubation period, 80 microliters of each tube were spotted on Whatman GF/A glass filters, washed extensively with cold 5% trichloracetic acid, dried and counted in a toluene based scintillation fluid using an Inter-technique SL30 scintillation counter. A control was made in which $|^3H|$poly r(AU) was incubated with RNAses A+T_1 in the absence of hnRNP (▲).

difficult to detect in crude fractions and especially nuclear ones and was drastically increased after chromatography on DEAE-cellulose, raising the possibility that an activity could be actually present in hnRNP although in a repressed ~~form~~. Indeed, chromatography of hnRNP on a DE52 column revealed a peak of RNAse D against $|^3H|$poly r(AU) in the flow-through, no activity being found in the elution gradient (Figure 2). It is noteworthy that the Krebs enzyme also did not bind to DEAE-cellulose under the same conditions (21).

Should the effectiveness of DEAE-cellulose chromatography in revealing hnRNP RNAse D be due to the removal of endogenous RNA, the same result should be obtained by its enzymatic degradation. As expected, prior treatment of hnRNP by a combination of RNAse A (10 µg/ml) and T_1 (50 units/ml) led to the appearance of a degradative activity towards poly r(AU) while this substrate was fully resistant to these RNAses in the absence of hnRNP (Figure 1).

The possibility that this degradative activity could be due to a non-specific exonuclease (for example phosphodiesterase) is ruled out by the absence of mononucleotides in the digestion products of $|^3H|$poly r(AU) analysed by DEAE-Sephadex urea column chromatography (29) (results not shown). Furthermore, the

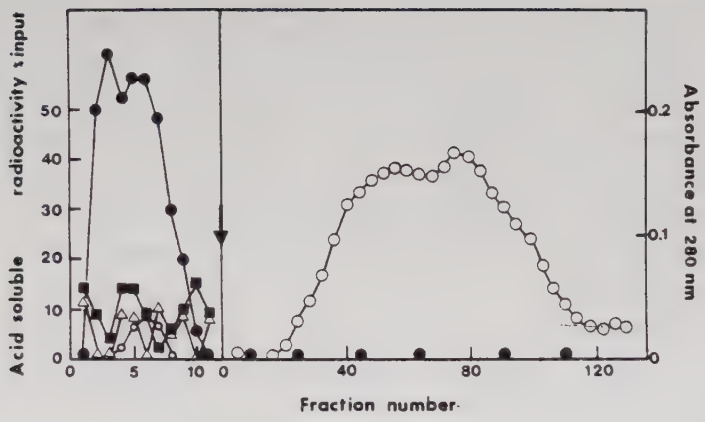


Fig. 2 :
Pattern of RNAse D activity after DE52 chromatography of hnRNP. 10 ml of hnRNP (15 mg) in buffer B were loaded onto a 5 ml (1 cm ϕ) Whatman DE52 column equilibrated with the same buffer. After washing until no more protein comes out, elution was then carried out at a flow rate of 10 ml/hr by a linear 150 ml gradient of NaCl (50-500 mM) in buffer B. Respectively 0.8 and 1.5 ml fractions were collected before and after starting the gradient and were assayed for absorbance at 280 nm (○) and hydrolytic activities against poly r(AU) (●), poly r(A)-poly d(T) (■) and poly r(A) (△) using 20 microliters aliquots.

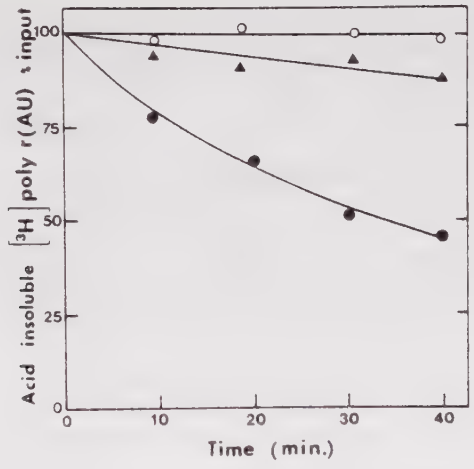


Fig. 3 :
Inhibition by ethidium bromide and phage ϕ6 RNA of RNAse D activity from hnRNP. To 20 microliters aliquots of the peak tube of activity from Figure 2 were added 80 microliters of standard RNAse D assay buffer (21) containing 4,000 cpm $|^{3}H|$poly r(AU) with no addition (●) or in the presence of 0.1 mM ethidium bromide (○) or 1.5 microgram ϕ6 RNA (▲) which represents about 100 fold excess over poly r(AU). Each tube was incubated and processed as in Figure 1.

DE52 flow-through fractions contained little, if significant, activity against either $|^{14}C|$poly r(A) or $|^{14}C|$poly r(A)-poly d(T) as compared to $|^{3}H|$poly r(AU)

(Figure 2). Inhibition by ds RNA from phage ϕ6 and by ethidium bromide (Figure3) which specifically intercalates into duplex structures (30) is also in keeping with the ds specific nature of the present enzyme.

It should be noted that close examination of Calvet and Pederson's data (31) on the digestion of hnRNP by various ribonucleases shows no indication of such an RNAse D activity against endogenous ds RNA even after digestion with RNAses A+T_1. This discrepancy may be due to the fact that we have not assayed for degradation of the endogenous substrate. This point is currently under investigation.

The relevance of the present enzyme to the endoribonuclease previously detected by Niessing and Sekeris (32) in rat liver hnRNP is not clear as no specificity similar to ours was reported by these authors. Their enzyme might well be responsible for the extensive degradation of bulk hnRNA that takes place during self-incubation of hnRNP (24).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the C.N.R.S., I.N.S.E.R.M., D.G.R.S.T. Ligue Contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale. Thanks are due to Ms Vié for expert technical assistance and to Ms Loevenbruck for typing the manuscript.

REFERENCES

1. TILGHMAN, S.M., CURTIS, P.J., TIEMEIER, D.C., LEDER, P. & WEISSMANN, C. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1309-1313
2. ROBERTSON, H.D., WEBSTER, R.E. & ZINDER, N.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 82-91
3. DUNN, J.J. & STUDIER, F.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3296-3300
4. NIKOLAEV, N., SILENGO, L. & SCHLESSINGER, D. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3361-3365
5. MONTAGNIER, L. (1968) C.R.H. Acad. Sci. Paris D267, 1417-1420
6. STERN, R. & FRIEDMAN, R.M. (1970) Nature (London), 226, 612-616
7. HAREL, J. & MONTAGNIER, L. (1971) Nature New Biology,229, 106-108
8. de MAEYER, E., de MAEYER-GUIGNARD, J. & MONTAGNIER, L. (1971) Nature New Biology, 229, 109-110
9. JELINEK, W. & DARNELL, J.E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2537-2541
10. KRONENBERG, L.H. & HUMPHREYS, T. (1972) Biochemistry, 11, 2020-2026
11. RYSKOV, A.P., FARASHYAN, V.R. & GEORGIEV, G.P. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 262, 568-572
12. PATNAIK, R. & TAYLOR, M.W. (1973) Biochemistry, 12, 1990-1995
13. JELINEK, W., MOLLOY, G., FERNANDEZ-MUNOZ, R., SALDITT, M. & DARNELL, J.E. (1974) J. Mol. Biol. 82, 361-370
14. MONCKTON, P.B. & NAORA, H. (1974) Biochim. Biophys. Acta 335, 139-154
15. TORELLI, U., TORELLI, G., CADOSSI, R. & FERRARI, S. (1974) Haematologica, 59, 393-400
16. ROBERTSON, H.D., DICKSON, E. & JELINEK, W. (1977) J. Mol. Biol. 115, 571-589
17. STAMPFER, M., ROSBASH, M., HUANG, A.S. & BALTIMORE, D. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 217-224
18. NAORA, H. & WHITELAM, J.M. (1975) Nature (London), 256, 756-759
19. RYSKOV, A.P., KRAMEROV, D.A. & GEORGIEV, G.P. (1976a) Biochim. Biophys. Acta, 447, 214-229